

Kjemiske og biokjemiske studier av *Tulbaghia alliacea*

Stig Øyvind Hjelmås



Masteroppgave

Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt

Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet

UNIVERSITETET I OSLO

Våren 2010

Forord

Jeg vil først og fremst gi en stor takk til Karl Egil Malterud og Helle Wangensteen, for en særdeles god veiledning. Begge to har hjulpet meg svært mye med både oppgaven og laboratoriearbeid. Det var tungt å fortsette med masteroppgaven etter lab-ulykken, men Malterud og Wangensteens innsats og glede for arbeidet har gitt meg inspirasjon til å fullføre oppgaven.

Videre fortjener Samantha Tamburan oppmerksomhet da hun var til stor hjelp ved interleukin-6-arbeidet i Sør-Afrika.

Jeg vil også takke reisefølget mitt i Sør-Afrika, Paula Marie Bräunlich og Hanne A. Hjelmås for en minnerik tur.

Til slutt vil jeg takke alle ved avdelingen for mange hyggelige samtaler gjennom hele masteroppgaveåret.

Oslo, 30.05.2010

Stig Øyvind Hjelmås

Innholdsfortegnelse

1. SAMMENDRAG	10
2. FORKORTELSER	12
3. HENSIKT MED OPPGAVEN	13
4. BAKGRUNN	1
4.1 TULBAGHIA ALLIACEA	1
4.1.1 Lokale navn	1
4.1.2 Botanisk klassifisering	1
4.1.3 Botaniske forhold	1
4.1.4 Tradisjonell bruk	1
4.1.5 Tidligere forskning	2
4.2 ANTIOKSIDANTER OG FRIE RADIKALER	3
4.2.1 Antioksidanter	3
4.2.2 Frie radikaler	3
4.2.3 Xantinoksidase	3
4.2.4 DPPH	4
4.2.5 Interleukin-6	5
5. EKSPERIMENTELT	7
5.1 MATERIALER	7
5.1.1 Kjemikalier	7
5.1.2 Apparatur	8
5.2 METODER	11
5.2.1 Generelt	11
5.2.2 Innveing	11
5.2.3 Plantemateriale	11
5.2.4 NMR-spektroskopi	11
5.3 EKSPERIMENTELL UTFØRELSE	11
5.3.1 Ekstraksjon av plantemateriale	11
5.3.2 Væske-væske ekstraksjon av metanolrækstraktet	12
5.3.3 DPPH-scavenging av rækstraktene	13
5.3.4 Xantinoksidase-test av rækstraktene	13

5.4	ARBEID MED ETOAC-FRAKSJONENE.....	14
5.4.1	NMR.....	14
5.4.2	Versaflash kolonnekromatografi av EtOAc-E	15
5.4.2.1	Analytisk TLC	15
5.4.2.2	NMR-spektroskopi.....	16
5.4.2.3	DPPH-spraying	16
5.4.2.4	XO-hemming	16
5.4.3	Sephadex LH20 kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2.....	16
5.4.3.1	Analytisk TLC	17
5.4.3.2	NMR	18
5.4.3.3	DPPH-scavenging	18
5.4.3.4	XO-hemming	18
5.4.4	Sephadex LH20 kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2,s1	18
5.4.4.1	Analytisk TLC	19
5.4.4.2	NMR	19
5.4.5	Versaflash kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2,s1,s1.....	19
	Analytisk TLC	20
5.4.5.2	NMR	20
5.4.5.3	DPPH-scavenging og XO-hemming.....	20
5.4.5.4	Acetylering av EtOAc, v1-2,s1,s1,v1	20
5.4.5.5	Analytisk HPLC.....	21
5.4.5.6	NMR	21
5.4.5.7	Analytisk HPLC.....	22
5.4.5.8	NMR	22
5.4.6	MCI gel kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2,s4	22
5.4.6.1	Analytisk TLC	23
5.4.6.2	NMR	23
5.4.6.3	Analytisk HPLC.....	23
5.4.6.4	DPPH-scavenging og XO-hemming.....	23
5.4.7	Preparativ HPLC EtOAc, v1-2,s4,m3.....	24
5.4.7.1	Analytisk HPLC etter preparativ	24

5.4.7.2 NMR.....	24
5.5 ARBEID MED BUOH-FRAKSJONENE.....	24
5.5.1 <i>Versaflash kolonnekromatografi av BuOH-E</i>	24
5.5.1.1 Analytisk TLC.....	25
5.5.1.2 NMR-spektroskopi.....	25
5.5.1.3 DPPH-spraying	25
5.5.2 <i>Sephadex LH20 kolonnekromatografi av BuOH v2-3</i>	26
5.5.2.1 Analytisk TLC.....	26
5.5.2.2 NMR.....	26
5.5.2.3 DPPH-scavenging	26
5.5.2.4 XO-hemming.....	27
5.5.3 <i>Sephadex LH20 kolonnekromatografi av BuOH v2-3, s4</i>	27
5.5.3.1 Analytisk TLC.....	27
5.5.3.2 NMR.....	28
5.5.3.3 DPPH-scavenging og XO-hemming	28
5.5.4 <i>Versaflash kolonnekromatografi av BuOH, v2-3,s4,s2</i>	28
5.5.4.1 Analytisk TLC.....	29
5.5.4.2 NMR.....	29
5.5.5 <i>Preparativ HPLC av BuOH, v2-3,s4,s2,v1</i>	30
5.5.5.1 NMR.....	30
5.5.5.2 DPPH-scavenging og XO-hemming	30
5.5.6 <i>MCI gel kolonnekromatografi av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4 (1)</i>	30
5.5.6.1 Analytisk TLC.....	31
5.5.6.2 NMR.....	31
5.5.6.3 Analytisk HPLC	31
5.5.6.4 DPPH-scavenging og XO-hemming	31
5.5.6.5 MCI gel av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4(2).....	32
5.5.6.6 Analytisk HPLC	32
5.5.6.7 NMR.....	32
5.5.7 <i>Preparativ HPLC av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2)</i>	32
5.5.7.1 Analytisk HPLC av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3	32

5.5.7.2 NMR	32
5.5.7.3 Massespektrometri	33
5.6 ARBEID MED DCM-FRAKSJONENE	33
5.6.1 Versaflash kolonnekromatografi av DCM-E – normalfase	33
5.6.1.1 Analytisk TLC	34
5.6.2 Versaflash kolonnekromatografi av DCM, v3	34
5.6.2.1 Analytisk TLC	35
5.6.2.2 NMR	36
5.6.2.2 DPPH-scavenging	36
5.6.2.3 XO-hemming	36
5.6.3 Versaflash kolonnekromatografi av DCM, v4	36
5.6.3.1 Analytisk TLC	37
5.6.3.2 NMR	37
5.6.4 HPLC av DCM, v4, v3	37
5.6.4.1 NMR	38
5.6.4.2 Ferulasyre	38
5.6.5 RP18 kolonnekromatografi av DCM, v4, v6	38
5.6.5.1 Analytisk HPLC	39
5.6.5.3 DPPH-scavenging og XO-hemming	39
5.6.6 RP18 kolonnekromatografi av DCM, v4, v6, rp1	39
5.6.6.1 Analytisk HPLC	40
5.6.6.2 NMR	40
5.6.6.3 DPPH-scavenging	40
5.6.7 Versaflash kolonnekromatografi DCM, v5	40
5.6.7.1 Analytisk TLC	41
5.6.7.2 NMR	41
5.6.8 HPLC av DCM, v5, v1	41
5.6.8.1 NMR	41
5.6.9 Versaflash kolonnekromatografi av DCM, v6	41
5.6.9.1 Mengdevurdering på TLC-plate	42
5.6.9.2 NMR	42

5.6.10	<i>RP18 kolonnekromatografi av DCM v6,v1</i>	42
5.6.10.1	Analytisk HPLC	43
5.6.10.2	NMR.....	43
5.6.10.3	Polarimeter	43
5.6.11	<i>Preparativ HPLC av DCM, v6,v1,rp3 og rp4</i>	44
5.6.11.1	Analytisk HPLC	44
5.6.11.2	NMR.....	44
5.7	FULLBLODASSAY AV DCM-E, ETOAC-E, BUOH-E, ETOAC v1-2,s1,s1,v1 OG BUOH, v6.....	44
5.7.1	<i>ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)</i>	46
5.7.1.1	Klargjøring av mikrotiterplate	47
5.7.1.2	ELISA-assay	47
6.	RESULTATER OG DISKUSJON	48
6.1	EKSTRAKSJON AV PLANTEMATERIALE	48
6.1.1	<i>NMR-spektroskopi DCM-E</i>	48
6.1.2	<i>NMR-spektroskopi MeOH-E</i>	49
6.1.3	<i>XO-hemming</i>	49
6.1.4	<i>DPPH-scavenging</i>	50
6.2	VIDERE ARBEID.....	50
6.2.1	<i>Væske-væske ekstraksjon</i>	50
6.2.2	<i>DPPH-scavenging</i>	51
6.2.3	<i>NMR av BuOH-E</i>	52
6.2.4	<i>NMR av EtOAc-E</i>	52
6.3	VERSAFLASH KOLONNEKROMATOGRAFI AV ETOAC-E	52
6.3.1	<i>DPPH-spraying av EtOAc, v1-7</i>	53
6.3.2	<i>DPPH-scavenging</i>	54
6.3.3	<i>XO-hemming</i>	54
6.3.4	<i>Sephadex kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2</i>	55
6.3.5	<i>NMR av EtOAc, v1-2,s3-6</i>	55
6.3.6	<i>XO-hemming av EtOAc, v1-2,s2-6</i>	56
6.3.7	<i>DPPH-scavenging av EtOAc, v1-2,s2-6</i>	57

6.3.8	<i>MCI GEL kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2,s4</i>	58
6.3.9	<i>DPPH-scavenging</i>	58
6.3.10	<i>XO-hemmende aktivitet</i>	59
6.3.11	<i>NMR av EtOAc, v1-2,s4,m5</i>	60
6.3.12	<i>Scopoletin</i>	60
6.3.13	<i>NMR av EtOAc, v1-2,s4,m3</i>	61
6.3.14	<i>Analytisk HPLC av EtOAc, v1-2,s4,m3</i>	61
6.3.15	<i>Preparativ HPLC av EtOAc, v1-2,s4,m3</i>	61
6.3.16	<i>NMR av EtOAc, v1-2,s4,m3,prep 8-9 og mulig struktur</i>	61
6.3.17	<i>Videre separering av EtOAc-kolonneforurensing</i>	64
6.4	ARBEID MED BUOH-FRAKSJONENE	64
6.4.1	<i>DPPH-scavenging</i>	65
6.4.2	<i>Videre arbeid med BuOH-fraksjonene</i>	65
6.4.3	<i>DPPH-scavenging</i>	65
6.4.4	<i>NMR av BuOH, v2-3,s4,s2,v1</i>	66
6.4.5	<i>Preparativ HPLC</i>	66
6.4.6	<i>NMR</i>	67
6.4.7	<i>MCI-gel kromatografi av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4</i>	67
6.4.8	<i>DPPH-scavenging</i>	69
6.4.9	<i>XO-hemmende aktivitet</i>	69
6.4.10	<i>NMR BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2)</i>	69
6.4.11	<i>Preparativ HPLC av v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2)</i>	70
6.4.12	<i>NMR og MS av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3</i>	70
6.5	ARBEID MED DCM-FRAKSJONENE	72
6.5.1	<i>DCM, v4,v3</i>	73
6.5.2	<i>Biologiske tester av ferulasyre</i>	74
6.5.3	<i>XO-test på ferulasyre</i>	74
6.5.4	<i>DPPH-test på ferulasyre</i>	75
6.5.5	<i>DCM, v4,v6</i>	75
6.5.6	<i>DPPH-scavenging</i>	76
6.5.7	<i>XO-hemmende effekt</i>	76

6.5.8	<i>RP18 kolonnekromatografi av DCM, v4,v6,rp1</i>	76
6.5.9	<i>NMR av DCM, v4,v6,rp1,rp1</i>	77
6.5.10	<i>DPPH-scavenging</i>	78
6.5.11	<i>DCM, v5,v1-4</i>	78
6.5.12	<i>DCM, v6,v1-4</i>	79
6.5.13	<i>NMR av DCM, v6,v1</i>	79
6.5.14	<i>RP18 av DCM, v6,v1</i>	80
6.5.15	<i>NMR av DCM, v6,v1,rp1-7</i>	80
6.5.16	<i>Optisk rotasjon</i>	81
6.5.17	<i>2R,3R-2-C-metyl-erytronolakton</i>	81
6.5.18	<i>DPPH-scavenging</i>	82
6.5.19	<i>XO-hemming</i>	82
6.5.20	<i>DCM, v6,v1,rp3</i>	82
6.6	FULLBLODASSAY OG ELISA (ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)	82
7.	KONKLUSJON	87
8.	VEDLEGG	89
8.1	METODER HPLC	89
8.2	FLYTSKJEMA	92
8.2.1	<i>Flytskjema 1</i>	92
8.2.2	<i>Flytskjema 2</i>	93
8.2.3	<i>Flytskjema 3</i>	94
8.2.4	<i>Flytskjema 4</i>	95
8.2.5	<i>Flytskjema 5</i>	96
8.2.6	<i>Flytskjema 6</i>	97
8.2.7	<i>Flytskjema 7</i>	98
8.2.8	<i>Flytskjema 8</i>	99
8.2.9	<i>Flytskjema 9</i>	100
8.2.10	<i>Flytskjema 10</i>	101
8.3	NMR-SPEKTRA	102
	KILDELISTE	126

1. Sammendrag

Ferdig opphakket og tørket rot av *Tulbaghia alliacea* L.f ble ekstrahert med diklormetan og metanol. Metanolekstraktet ble videre separert med væske-væske-ekstraksjon og fordelt i etylacetat, butanol og vann. Disse fem rækstraktene var utgangspunktet for videre separasjon ved hjelp av Versaflash-, Sephadex LH20-, MCI- og reverse phase C18-kolonnekromatografi. Det ble også benyttet preparativ og analytisk HPLC samt analytisk tynnsjikt-kromatografi. De isolerte forbindelsene ble strukturoppklart ved hjelp av ^1H -, ^{13}C -, APT-, DEPT-, COSY- og HMQC-NMR-spektroskopi. Massespektrometer ble benyttet på ett av de identifiserte stoffene for å bekrefte molekylets masse.

2-propensyre, 2-metyl-3-[tetrahydro-2,3,5-trihydroxy-6-(hydroxymetyl)-2H-pyran-2-yl] ble isolert og identifisert fra butanolfasen av metanolekstraktet. Scopoletin og 1-deoksy-1-metylamino-3,6-(1,2-dihydroksyetyliden)-D-glukose var sannsynlige strukturer som ble isolert fra etylacetatfasen. Ferulasyre og 2*R*,3*R*-2-C-metyl-erytronolakton ble isolert og identifisert fra diklormetanfasen. I tillegg ble deler av et svovelholdig molekyl identifisert. Et stoff som lignet vaniljesyre ble også isolert. 2-propensyre, 2-metyl-3-[tetrahydro-2,3,5-trihydroxy-6-(hydroxymetyl)-2H-pyran-2-yl] har aldri tidligere blitt identifisert fra en plante og er dermed et nytt molekyl i planteverdenen. De andre identifiserte molekylerne er ikke tidligere rapportert i fra noen plantedeler av *T. alliacea*.

Alle rækstraktene samt noen utvalgte fraksjoner og isolerte forbindelser ble testet for biologiske aktiviteter ved hjelp av radikalscavengingaktivitet overfor radikalet DPPH, og hemming av xantinoksidase (XO) fra kumelk med hypoxantin som substrat. I tillegg ble 5 fraksjoner testet for pro- og antiinflammatoriske egenskaper ved måling av IL-6 konsentrasjon i humant blod etter tilsetning av ekstraktene. Fraksjonene fra etylacetatekstraktet hadde høyest DPPH- og XO-aktivitet. Vannelekstraktet hadde lavest aktivitet. Disse to testene var ikke tidligere utført på 2*R*,3*R*-2-C-metyl-erytronolakton, molekylet viste seg å være inaktivt både som DPPH-scavenger og XO-hemmer.

Etylacetat- og diklormetanrækstraktet hadde kraftigste antiinflammatoriske egenskaper av de fem testede fraksjonene.

2. Forkortelser

APT	Attached Proton test
BuOH	Butanol
C	Karbon
COSY	Correlation Spectroscopy
DCM	Diklormetan
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DMSO	Dimetylsulfoksid
DPPH	1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOAc	Etylacetat
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
H	Hydrogen
MeOH	Metanol
NMR	Nukleær Magnetisk Resonans
OH	Hydroksylgruppe
RP	Reverse Phase
S	Sephadex LH20
SD	Standardavvik
TLC	Thin Layer Chromatography
TMS	Tetrametylsilan
UV	Ultrafiolett
V	Versaflash
XO	Xantinoksidase

3. Hensikt med oppgaven

Hensikten med oppgaven var å isolere og identifisere aktuelle innholdsstoffer fra en Sør-Afrikanske medisinsplante *Tulbaghia alliacea*. I tillegg skulle det utføres enkelte biologiske tester på både delfraksjoner og renstoffer. Et av målene var å isolere substanser med DPPH-radikalfangende og/eller xantinoksidasehemmende effekt. Et annet mål var å undersøke planten for immunregulerende effekt i forhold til cytokinet IL-6.

4. Bakgrunn

4.1 *Tulbaghia alliacea*

4.1.1 Lokale navn

Engelsk: wild garlic.

Afrikaans: wilde knoffel.

Zulu: isihaga (Wyk et al 2009).

4.1.2 Botanisk klassifisering

Latinsk navn: *Tulbaghia alliacea* L.f.

Orden: *Asparagales*

Familie: *Alliaceae*

Slekt: *Tulbaghia*

Art: *Alliaceae*

4.1.3 Botaniske forhold

T. alliacea er en geofytt med jordstengler opp til 10 cm lange. Bladene er lange og smale, typisk 15-25 cm x 0,3-0,5 cm. Planten lukter løk når den blir skrubbet eller skadet. Om våren danner planten ”umbel clusters” som inneholder 6-10 individuelle blomster som er mellom 15-30 cm lange. *T. alliacea* vokser i sand- og leirerik jord i Western og Eastern Cape-provinsene, fra Clanwilliam til Cape-halvøya, øst til Port Elisabeth og nord inntil KwaZulu-Natal, Mpumalanga og Gauteng. Planten finnes også i Swaziland, Botswana og Zimbabwe (Scott og Springfield 2004). Slekten *Tulbaghia* inneholder ca 60 arter (ipni 2010).

4.1.4 Tradisjonell bruk

T. alliacea brukes vanligvis som en infusjon i vann eller melk og tas oralt. I Eastern Cape brukes oppskrapet løk til å tilberede medisinsk bad og brukes mot lammelser, revmatisme og for å senke kroppstemperaturen hos syke pasienter. I Western Cape tas løken oralt for å behandle feber, tuberkulose, influensa, hypertensjon og innvollsorm. *Tulbaghia violacea* Harv. brukes som erstatning for *T. alliacea* der *T.*

alliacea ikke er å skaffe. *Tulbaghia* inntas som enten tørket eller fersk plante. Brukes fersk plante skal 1 løk deles opp og infusere med 1 liter kokende vann i en lukket beholder. Når blandingen er kald skal infusjonen filtreres og oppbevares kjølig. Brukes det tørket materiale skal 2 toppede teskjeer infusere med 1 liter kokende vann. Voksne skal drikke 1 full tekopp 2 ganger daglig. Barn benytter halv dosering (Scott og Springfield 2004).

4.1.5 Tidligere forskning

Det er gjort svært lite forskning på *T. alliacea*. Den sekundære kjemien i *Tulbaghia* er lite kjent. Mange av plantene fra den relaterte slekten *Allium* inneholder de svovelholdige stoffene alliin og nedbrytningsproduktet allicin. Disse, og lignende komponenter, står for den skarpe lukten til hvitløk. Det er rimelig å anta at lignende stoffer finnes i *Tulbaghia* (Scott og Springfield 2004). Som sagt er innholdsstoffene i *T. alliacea* stort sett ukjente, men et svovelholdig stoff, 2,4,5,7 tetrathiaoktan-4-oksidi, også kalt marasmin, er tidligere identifisert i kloroformrøekstrakt ved hjelp av TLC og NMR (Tamburan et al 2006). Marasmin og flere svovelholdige nedbrytningsprodukt som for eksempel 2,4,5,7 tetrathiaoktan og 2,4,5,7 tetrathiaoktan-2,2-dioksidi er tidligere identifisert i planten *T. violacea*. Marasmin er selv et nedbrytningsprodukt fra tiosulfinatet marasmin (Kubec et al 2002). Tamburan et al gjorde in vitro eksperiment med *T. alliacea* for å teste veksthemmende effekt mot 5 forskjellige sopparter. MeOH-, vann- og kloroformekstraktene viste bedre veksthemming av *Candida albicans* enn tilsvarende ekstrakt fra både *Allium sativum* og *T. violacea*. Generelt hadde MeOH-ekstraktet av *T. alliacea* dårligere veksthemming enn både vann- og kloroformekstraktet.

Den nær beslektede planten *T. violacea* har vist angiotensinkonvertase-hemmende (ACE-hemmende) effekt både in vitro og in vivo (Ramesar 2008). Duncan et al viste at både vann og etanolekstrakt av *T. violacea* hadde ACE-hemmende aktivitet og at tanniner ikke var ansvarlige for hemmingen. Det er identifisert flere flyktige komponenter fra *T. violacea*, deriblant bis(metyltiometyl)disulfide og metyl-2-

tioetyltiometyltrisulfid som består av henholdsvis 48 og 16 vekt % av ferske overjordiske plantedeler (Pino et al 2008).

4.2 Antioksidanter og frie radikaler

4.2.1 Antioksidanter

En antioksidant er enhver substans som signifikant forsinket eller forhindrer oksidasjon av et oksiderbart substrat når antioksidanten er til stede i lav konsentrasjon sammenlignet med det oksiderbare substratet. Oksidanter kan for eksempel skade DNA, proteiner, lipider og urinsyre som igjen kan gjøre ytterligere skade på kroppen.

4.2.2 Frie radikaler

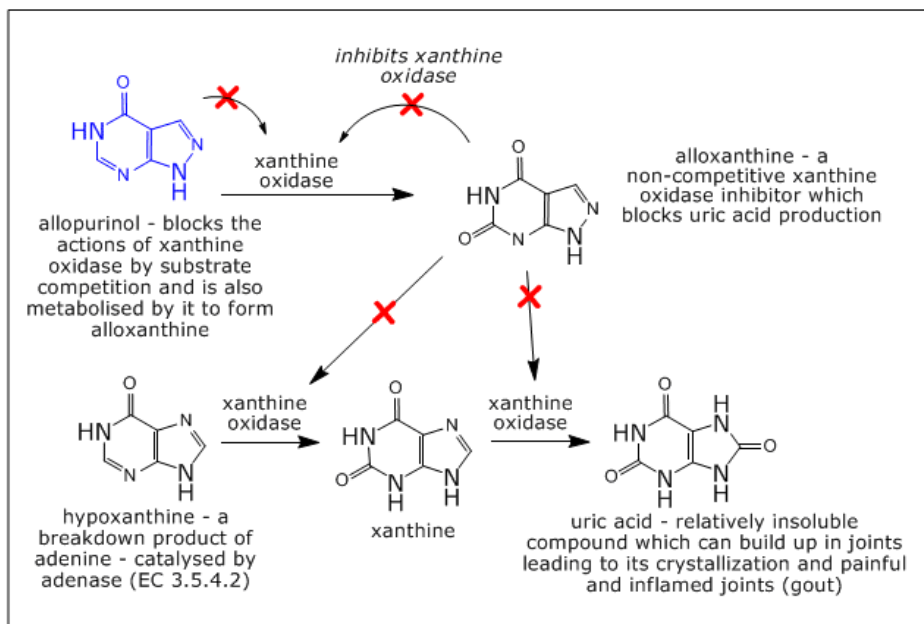
Elektroner vil vanligvis gå sammen i par. Hvert par beveger seg innen et definert område (atomisk eller molekylær orbital). Ett fritt radikal er en hvilken som helst specie som inneholder ett eller flere uparede elektroner som kan eksistere selvstendig. Eksempler på radikaler som blir produsert i kroppen er $O_2^{\bullet-}$ og OH^{\bullet} . Disse stoffene kalles også for reaktive oksygenspecies (ROS). Frie radikaler kan bestå av molekyler som ikke inneholder oksygen som f.eks Cl^{\bullet} , som går under kategorien reaktive klorspecier. Frie radikaler og ROS dannes hele tiden i menneskekroppen. Noen dannes som biprodukter som kan være skadelige, mens andre kan ha nyttige funksjoner som for eksempel bakteriedrap (Halliwell 2005).

4.2.3 Xantinoksidase

Xantinoksidase er et enzym som har som hovedoppgave å oksidere hypoxantin til xantin til urinsyre (Akowuah et al 2006). Xantinoksidase anses å være viktig for å danne superoksidradikalanion, som dannes samtidig med urinsyren.

Superoksidradikalanionet kan videre danne mer reaktive radikaler som hydroksylradikalet (Malterud 2010). Noen radikaler har evne til å igangsette peroksidering av lipider som for eksempel flerumettede fettsyrer (Halliwell 1999). Denne peroksideringen kan gi celledskade som et resultat av oksidativt stress. Inhibering av xantinoksidase kan derfor være viktig for å redusere oksidativt stress

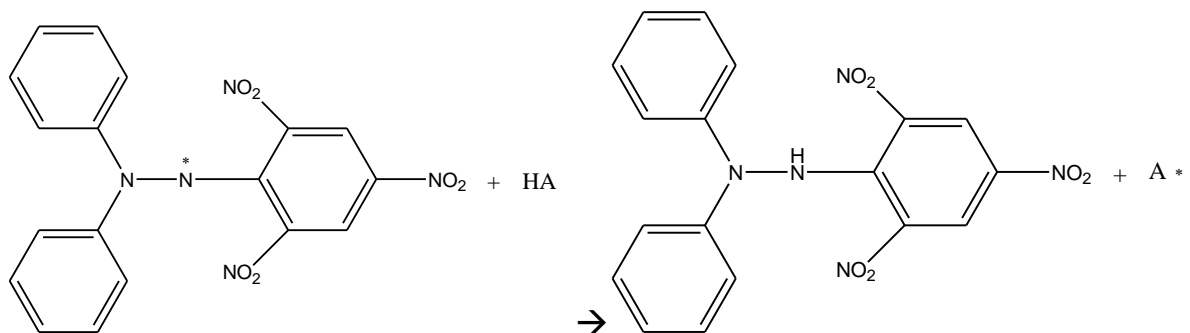
som er relatert til degenerative sykdommer (Akowuah et al 2006). Allopurinol, en kraftig hemmer av xantinoksidase, er et registrert legemiddel som brukes mot blant annet urinsyregikt (Felleskatalogen 2010). Det er gjort dyreforsøk som viser at en reduksjon av xantinoksidase øker hjertets pumpeevne, øker endotelfunksjon, reduserer inflammasjon, reduserer myokardial oksidering og blodplatesammenklumping (Ellestad 2007).



(Kanji Foundry Press 2010)

4.2.4 DPPH

1,1-difenyl-2-pikrylhydrazyl (DPPH) er et stabilt fritt radikal som har en mørk fiolett farge på grunn av sitt uparede elektron (Blois 1958). Radikalscavengingeffekt kan observeres spektrofotometrisk ved tap av absorbans ved 517 nm ettersom det svakt gule ikke-radikalet blir dannet (Malterud et al 1993). Denne omdannelsen av radikal til ikke-radikal er støkiometrisk med tanke på antall elektroner som tas opp. Siden DPPH reagerer med de fleste vanlige antioksidanter, men ikke interagerer med glukose, er DPPH en godt egnet substans for å avgjøre antioksidanteffekten til biologisk materiale (Blois 1958).



Omdanningen av radikal til ikke-radikal (Blois 1958).

4.2.5 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) er et multifunksjonelt cytokin som regulerer immunrespons, hematopoiesen, akutfaserespons og inflammasjon (Ishihara og Hirano 2002). IL-6 er et 4-helisk protein som binder seg til spesifikke IL-6-reseptorer på målceller og på to molekyler på glykoprotein 130 (Kallen et al 1997). Ved en begynnende akutt inflammasjon vil IL-6 mediere akutfaseresponsen. Når IL-6 sin proinflammatoriske aktivitet vedvarer, vil en akutt inflammasjon gå over til kronisk inflammasjon. I denne kroniske fasen vil IL-6 støtte vekst og overlevelse av lymfocytter og myeloider, som igjen kan føre til økt IL-6 nivå. Dette danner basisen for de forsterkende stegene som fører til kronisk inflammatorisk spredning (proliferasjon). Ved en autoimmun sykdom vil IL-6 ikke bare opprettholde inflammasjonen men også modifisere immunresponsen. Mange celler som T-, B-, endotelceller, fibroblaster og synoviocytter kan danne IL-6.

Det er observert at overstimulering av IL-6 hos mus gir antistoffproduksjon og glomerulonefritt som ligner det som skjer ved systemisk lupus erythematosus i mennesker. I tillegg vil også faren for dannelse av ondartet beinmargskreft øke. Serumkonsentrasjonen av IL-6 er signifikant høyere hos mennesker med Crohns sykdom, en kronisk inflammatorisk tarmsykdom, enn hos friske mennesker. IL-6 konsentrasjonen er i samsvar med aktiviteten til sykdommen og kan brukes for å måle sannsynligheten for tilbakefall etter fullført steroidbehandling.

Reumatoid artritt er både en autoimmun- og en kronisk inflammatorisk sykdom som ødelegger beinmassen. IL-6 konsentrasjonen er kraftig forhøyet i synovialvæsken hos mennesker med reumatoid artritt. Det er også en sammenheng mellom

serumkonsentrasjonen av IL-6 og en rekke akutfaseproteiner. Det er rimelig å anta at IL-6 produseres i reumatoide ledd som et resultat av unormal immunsystemaktivitet (Ishihara og Hirano 2002). Det har blitt utført flere studier av en IL-6 antagonist som heter tocilizumab. Denne hemmeren førte til signifikant forbedring av tegn og symptomer av reumatoid artritt, og en nesten normalisering av akutfaseresponsen (Smolen og Maini 2006). I dag er tocilizumab et registrert legemiddel i Norge under preparatnavnet RoActemra.

5. Eksperimentelt

5.1 Materialer

5.1.1 Kjemikalier

Kjemikalier	Produsent
Aceton purum	Chemi-Teknik AS, Oslo, Norge
Aceton-d6	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Antihumant IL-6 fra geit, kit-set	R&D Systems, Abingdon, England
Antihumant IL-6 fra mus, kit-set	R&D Systems, Abingdon, England
Bovint serumalbumin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
1-Butanol	Fluka Chemie, Buchs, Sveits
Ceric (1% cerium(IV)sulfat i 10% svovelsyre)	Merck, Darmstadt, Tyskland
Destillert vann	Farmasøytisk Institutt, Oslo, Norge
Difenylpikrylhydrazyl	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Diklormetan	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Dimetylsulfoksid	Merck, Darmstadt, Tyskland
Dinatriumhydrogenortofosfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
d-Kloroform	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
d-Metanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Eddiksyre	VWR International, Oslo, Norge
Etylacetat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Fargereagens A (H ₂ O ₂), kit-set	R&D Systems, Abingdon, England
Fargereagens B (tetrametylbenzidin), kit-set	R&D Systems, Abingdon, England
Fosfatbufret salin, PBS	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Humant blod	University of Western Cape, Bellville
Hypoxantin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Inkubator HEPA Class 100	Thermo Electron Corporation
Isopropanol	Areus, Oslo, Norge
Kaliumdihydrogenfosfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kaliumdihydrogenortofosfat	Merck, Darmstadt, Tyskland
Kaliumklorid	Merck, Darmstadt, Tyskland
MCI gel CHP20P	Supelco, Bellefonte, USA
Metanol HiPerSolv Chromanorm for HPLC	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Metanol purum	Chemi-Teknik, Oslo

N ₂ -gass	AGA, Oslo, Norge
Natriumklorid	Thomas Baker Chemicals, Mumbai, India
Phytohaemagglutinin, PHA	University of Western Cape, Bellville
Quercetin	Sigma, St. Louis, USA
Rekombinant humant IL-6	R&D Systems, Abingdon, England
RP18 silikagel	Merck, Darmstadt, Tyskland
Sephadex LH20	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige
Streptavidin-HRP	R&D Systems, Abingdon, England
Tetrametylsilan	Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland
Tungtvann	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Xantinoksidase fra kumelk	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

5.1.2 Apparatatur

Apparatatur	Produsent
<i>Analytisk tynnsjiktskromatografi</i>	
Kieselgel 60 F254, aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
RP18 F254, aluminiumsplater	Merck, Darmstadt, Tyskland
End-to-end pipetter, 20 µl, 50 µl, 100 µl	Modulohm, Herlev, Danmark
Elueringskar, glass	Camag, Muttenz, Sveits
TLC-sprayer GW-1	Merck, Darmstadt, Tyskland
<i>Automatpipetter</i>	
Finnpipette	Labsystems, Helsinki, Finland
Nichiryo modell 8100	Nichiryo, Tokyo, Japan
<i>Filter</i>	
Whatman, diverse størrelser	Whatman, Maidstone, England
HPLC-filter, 3mm, 0,45 µm acro LC	Chiron Laboratories AS, Trondheim, Norge
S&S filterpapir 594	Schleicher & Schüll, Dassel, Tyskland
Millex Millipore 0,20µm	

HPLC

Varian Prostar

Pumpe modell 210

Detektor Prep 9 x 1 mm

Preparativ kolonne:

Varian dynamax 250 x 21,4 mm

Varian, Walnut Creek, CA, USA

Varian 1002 TLL 2,5 ml sprøyte

Semipreparativ kolonne 10 ml/min:

Chromolith semiprep RP18 100-10 mm

Merck, Darmstadt, Tyskland

Analytisk kolonne:

Chromolith Performance RP18-E 100-4,6 mm

Merck, Darmstadt, Tyskland

Hitachi Elite Lachrom Organizer

Hitachi, Tokyo, Japan

Hitachi Elite Lachrom Column oven L-2300

Hitachi, Tokyo, Japan

Hitachi Elite Lachrom Autosampler L-2200

Hitachi, Tokyo, Japan

Hitachi Elite Lachrom Pump L-2130

Hitachi, Tokyo, Japan

Hitachi Elite Lachrom Diode Array Detector
L-2455

Hitachi, Tokyo, Japan

Kolonnekromatografi

Versaflash kolonneholder

Supelco, Bellefonte, USA

Buchi 681 kromatografpumpe

Buchi, Flawil, Sveits

Versapak silikakolonne

Supelco, Bellefonte, USA

Versapak spherical silikakolonne

Supelco, Bellefonte, USA

Versapak C18-kolonne

Supelco, Bellefonte, USA

FMI LAB PUMP modell RP-G150

Fluid Metering Inc., New York, USA

Flashkromatografi kolonne

Aldrich, Steinheim, Tyskland

Magnetrører

RCT Basic

Janke & Kunkel, Staufen, Tyskland

NMR

Bruker DPX 300

Bruker Biospin GmbH, Rheinstetten,
Tyskland

Varian Gemini 200

Varian, Palo Alto, CA, USA

Oljepumpe

Edwards E-Lab 2

Edwards High Vacuum Int., Sussex
England

Rotavapor

Rotavapor-R med varmebad W-240

Büchi, Flawil, Sveits

Ilmvac 400171 vakuumpumpe

Ilmvac, Ilmenau, Tyskland

IKA RV 10 S40

IKA

Ultralydbad

Bransonic 220

Branson Ultrasonics Corp., Geneve,
Sveits

UV-spektroskopi

UV-spektrofotometer:

Biochrom Libra S32 PC

Biochrom, Cambridge, England

UV-lampe:

Model UVSL-58 (254 og 366 nm)

Kyvetter:

Kvartskyvetter

Starna, Essex, England

Varmeskap

Varmeovn Heracus

Heracus, Hahau, Tyskland

Vekt

Sartorius modell A200S

Sartorius, Göttingen, Tyskland

Sartorius modell BP221S

Sartorius, Göttingen, Tyskland

Mettler PM4800 DeltaRange

Mettler-Toledo, Greifensee, Sveits

5.2 Metoder

5.2.1 Generelt

Målet med fraksjoneringsmetodene var å isolere og identifisere potensielt biologisk aktive substanser. Råekstrakter og alle underfraksjoner ble først undersøkt ved hjelp av analytisk tynnsjiktplater eller analytisk HPLC. Videre separeringsmetoder ble utført slik at prøvene ble rene nok til å benytte preparativ HPLC.

5.2.2 Innveiing

Det ble benyttet analysevekt ved totalvekt under 200 gram og overskålsvekt ved totalvekt over 200 gram.

5.2.3 Plantemateriale

Anvendt droge var tørket og opphakkert rot av *Tulbaghia alliacea*, som ble sendt til Farmasøytisk institutt i mars 2009. Plantemateriale ble oppbevart i forseglede plastposer i fryseren før bruk. Materiale ble innsamlet og identifisert ved University of Western Cape, Bellville, Sør-Afrika.

5.2.4 NMR-spektroskopi

Spektra ble vanligvis tatt opp på et Bruker DPX300-instrument (^1H : 300 MHz, ^{13}C : 75 MHz). Der Varian Gemini 200-instrumentet ble brukt er dette nevnt.

5.3 Eksperimentell utførelse

5.3.1 Ekstraksjon av plantemateriale

Reagenser

Diklormetan

Metanol

Utstyr

Erlenmeyerkolbe

Glassintertrakt

Whatman filterpapir

Rotavapor

Oljepumpe

Diklormetanelekstraksjon

T. alliacea (473,9 g) ble ekstrahert med ca 2 l diklormetan i 24 timer ved romtemperatur. Ekstraktet ble deretter filtrert og dampet inn ved 40 °C på rotavapor. Den regenererte diklormetanen ble brukt til ny ekstrahering. Underskuddet av diklormetan ble etterfylt for ny 24 timers ekstrahering. Samme prosedyre ble gjentatt ytterligere 2 ganger, altså totalt 24 timer x 3. Deretter ble plantematerialet ekstrahert i 72 timer til før ekstraktet ble filtrert og dampet inn til tørrhet. Total vekt diklormetanelekstraktet (DCM-E) ble 12,72g.

Metanolelekstraksjon

Ekstraksjonsmiddelet ble endret til metanol og *T. alliacea* ble ekstrahert med 2 l metanol i 24 timer x 3. Deretter ble plantematerialet ekstrahert i 12 dager før ekstraktet ble filtrert og dampet til tørrhet på rotavapor ved 55 °C.

5.3.2 Væske-væske ekstraksjon av metanolrækstraktet**Reagenser**

Etylacetat

1-Butanol

Destillert vann

Utstyr

Skilletrakt 2000 ml

Begerglass

Metanolekstraktet (MeOH-E, 42,13 g) ble suspendert i 0,5 l destillert vann og ekstrahert i skilletrakt med 5 x 0,5 l etylacetat. Inndamping av de samlede etylacetatfraksjonene i vakuum gav 5,52 g ekstrakt (EtOAc-E). Den vandige suspensjonen ble deretter ekstrahert på tilsvarende måte med 3 x 0,5 l 1-butanol, utbytte 9,77 g (BuOH-E). Vannfasen etter butanolekstraksjonen gav 22,35 g tørrstoff etter inndamping.

5.3.3 DPPH-scavenging av r ekstraktene

Reagenser

DPPH-pulver

DMSO

MeOH

Utstyr

UV-spektrofotometer

Kvartskyvetter

Plastspatel

Magnet

Magnetrører

DPPH (difenylikrylhydrazyl) ble løst i MeOH til en absorbens på 1,0 ved 517 nm. 50  l DMSO-løsninger av alle fem r ekstraktene (10 mg/ml) ble blandet med 2,95 ml DPPH-løsning. Nedgang i UV-absorbans ved 517 nm etter 5 minutter ble målt. Spektrofotometeret ble nullstillet ved hjelp av en blindprøve som inneholdt ca 3 ml MeOH.

5.3.4 Xantinoksidase-test av r ekstraktene

Reagenser

Fosfatbuffer pH 7,50

Hypoxantin

Xantinoksidase fra storfe

Destillert vann

DMSO

Quercetin

Utstyr

Magnetrører

pH-meter

UV-spektrofotometer

Hypoxantin (10mg) ble løst i 500 ml destillert vann. En bufferløsning av natriumhydrofosfat og kaliumdihydrofosfat ble løst i 1 liter destillert vann til pH 7,50. Xantinoksidase ble løst i buffer til en konsentrasjon på ca 1,8 units/ml og satt på is under hele forsøket. Alle fem rækstraktene ble testet ved å tilsette 1,85 ml buffer, 100 µl enzymløsning og 50 µl prøve i kjent konsentrasjon. Etter omrøring ble 1 ml hypoxantinløsning tilsatt og endring i absorbans ble målt etter 5 minutter ved 290 nm. For hvert fjerde forsøk ble enzymaktiviteten testet ved blindprøver bestående av 1 ml destillert vann, 50 µl DMSO, 1,85 ml buffer og 100 µl enzymløsning. Quercetin ble benyttet som positiv kontroll.

5.4 Arbeid med EtOAc-fraksjonene

5.4.1 NMR

Det ble tatt ^1H og ^{13}C NMR-spekter av EtOAc-rækstraktet ved hjelp av Gemini-200 (200 MHz for ^1H , 50 MHz for ^{13}C). Prøven ble løst i deuterert aceton.

5.4.2 Versaflash kolonnekromatografi av EtOAc-E

Reagenser

MeOH

Destillert vann

Aceton

Utstyr

Versaflash-apparat med tilhørende utstyr

Versapak C₁₈-kolonne (80x300 mm)

Dramglass 60 ml

Begerglass, 500 ml

Utførelse

Kolonnen ble kondisjonert med 1 l MeOH:vann (20:80). EtOAc-ekstraktet (5,52 g) ble løst i 80 ml MeOH. 10 ml av løsningen ble tatt ut for senere bruk. Deretter ble de resterende 70 ml filtrert og applisert på kolonnen. De første 450 ml eluent ble tatt separat. Det ble samlet totalt 92 fraksjoner à ca 50 ml.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-18	MeOH:Vann (20:80)	Ca 900 ml
19-40	MeOH:Vann (40:60)	Ca 1050 ml
41-56	MeOH:Vann (70:30)	Ca 750 ml
57-77	MeOH	Ca 1000 ml
78-92	Aceton:Vann (70:30)	Ca 750 ml

5.4.2.1 Analytisk TLC

Fraksjon 1-4, 6, 12, 18, 19, 23 ble applisert på en omvendtfase TLC-plate og eluert med MeOH:vann (20:80) tilsatt noen dråper eddiksyre. Fraksjon 23, 30, 37, 40-45, 46, 48, 50, 52, 54 ble applisert på en omvendtfase TLC-plate og ble utviklet med MeOH:vann (40:60) tilsatt noen dråper eddiksyre. Fraksjon 52, 54-58, 60, 62, 65, 70, 75, 80, 85 ble applisert på en omvendtfase TLC-plate og ble utviklet med MeOH:vann (80:20) tilsatt noen dråper eddiksyre. Etter endt utvikling og tørking, ble

platene betraktet i kort og langbølget UV-lys. De fraksjonene som så ut til å innehold samme komponenter ble slått sammen og dampet inn til tørrhet på rotavapor og oljepumpe.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-5	EtoAc, v1
6-37	EtoAc, v2
38-45	EtoAc, v3
46-50	EtoAc, v4
51-54	EtoAc, v5
55-60	EtoAc, v6
61-92	EtoAc, v7

5.4.2.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene ved hjelp av Gemini-200 (200 MHz for ^1H , 50 MHz for ^{13}C). I tillegg ble det tatt ^{13}C -spektra av fraksjon 1, 3 og 7. Alle fraksjonene ble løst i deuterert metanol.

5.4.2.3 DPPH-spraying

En TLC-plate ble påført en liten mengde av alle fraksjonene og sprayet med en kraftig DPPH-løsning, ca 40 mg/ml.

5.4.2.4 XO-hemming

Fraksjon v3-v7 ble testet for hemming av xantinoksidase som utført kap 5.3.4.

5.4.3 Sephadex LH20 kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2

Reagenser

Destillert vann

Metanol

Aceton

Etylacetat

Utstyr

Sephadex LH20 gel

Kolonne med ca 700 ml volum (indre diameter 4,5 cm, høyde 50 cm, 40 cm kolonnemateriale)

Stativ

Dramglass, 60 ml

Begerglass

Utførelse

Kolonnemateriale ble rørt ut i 450 ml MeOH:vann (50:50) og satt til svelling over natten. Kolonnen ble montert vertikalt og blandingen ble overført til kolonnen.

På bakgrunn av NMR-spektra ble EtOAc, v1 og v2 slått i sammen og løst i ca 15 ml MeOH:vann (50:50) og applisert på kolonnen. De første 220 ml ble samlet separat før fraksjonene ble fordelt i totalt 37 dramglass à 60 ml.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-9	MeOH:vann (50:50)	Ca 550 ml
10-15	MeOH:vann (70:30)	Ca 400 ml
16-23	MeOH	ca 500 ml
24-30	Aceton:vann (70:30)	ca 400 ml
31-37	EtOAc:aceton (50:50)	ca 450 ml

5.4.3.1 Analytisk TLC

Ca 20 µl av fraksjon 1-15 ble påført en omvendtfase TLC-plate som ble utviklet med MeOH:vann (30:70) tilsatt noen dråper eddiksyre som løpemiddel. Tilsvarende ble gjort med fraksjon 15-34, men ble utviklet med MeOH:vann (50:50) tilsatt noen dråper eddiksyre som løpemiddel. Etter at platene var ferdigutviklet og tørket ble de observert ved kort og langbølget lys. De fraksjonene som så ut til å inneholde like stoffer ble slått sammen til totalt 6 nye fraksjoner.

Kolonnefraksjoner	Fraksjon
1-6	EtOAc, v1-2,s1
7-9	EtOAc, v1-2,s2
10-13	EtOAc, v1-2,s3
14-19	EtOAc, v1-2,s4
20-26	EtOAc, v1-2,s5
27-37	EtOAc, v1-2,s6

5.4.3.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene og ^{13}C -spektra av fraksjon 1-5 ved hjelp av Gemini-200 (200 MHz for ^1H , 50 MHz for ^{13}C). Alle prøvene ble løst i deuterert MeOH.

5.4.3.3 DPPH-scavenging

Det ble målt DPPH-scavengingaktivitet av fraksjon EtOAc, v1-2, s2-s6. Se kap. 5.3.3.

5.4.3.4 XO-hemming

Det ble målt XO-hemming av fraksjon EtOAc, v1-2 s2-s6. Se kap. 5.3.4

5.4.4 Sephadex LH20 kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2,s1

EtOAc, v1-2,s1 ble løst i ca 5 ml MeOH:vann (20:80) og applisert på en ferdigkondisjonert (MeOH:vann (20:80)) kolonne. De første 200 ml ble samlet separat. Totalt 21 fraksjoner à 50 ml ble samlet

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-4	MeOH:vann (20:80)	Ca 200 ml
5-10	MeOH:vann (40:60)	Ca 300 ml
11-15	MeOH:vann (70:30)	Ca 250 ml
16-21	MeOH.aceton (50:50)	Ca 300 ml

5.4.4.1 Analytisk TLC

Alle fraksjonene ble applisert på en omvendtfase TLC-plate og utviklet med MeOH:vann (30:70) tilsatt noen dråper eddiksyre. Etter at platen var ferdigutviklet og tørket ble den sprayet med ceric-reagens (1% ceriumsulfat løst i 10% vandig svovelsyre) og satt i varmeskap i 5 minutter ved 105 °C. Deretter ble kolonnefraksjonene slått sammen til 7 nye fraksjoner.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-5	EtOAc, v1-2,s1,s1
6-7	EtOAc, v1-2,s1,s2
8-9	EtOAc, v1-2,s1,s3
10-12	EtOAc, v1-2,s1,s4
13-15	EtOAc, v1-2,s1,s5
16-18	EtOAc, v1-2,s1,s6
19-21	EtOAc, v1-2,s1,s7

5.4.4.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene og ^{13}C -spektra av fraksjon 1 og 2 ved hjelp av Gemini-200 (200 MHz for ^1H , 50 MHz for ^{13}C). Prøvene ble løst i deuterert MeOH.

5.4.5 Versaflash kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2,s1,s1

EtOAc, v1-2,s1,s1 ble løst i ca 5 ml MeOH:vann (20:80) og applisert på en ferdigkondisjonert omvendtfase Versaflash silikakolonne (40x150 mm). Totalt 23 fraksjoner à 60 ml ble samlet.

Fraksjon	Mobilfase tilsatt 1% eddiksyre	Mengde
1-5	MeOH:vann (20:80)	Ca 250 ml
6-9	MeOH:vann (40:80)	Ca 200 ml
10-17	MeOH:vann (70:30)	Ca 400 ml
18-23	MeOH	Ca 300 ml

Analytisk TLC

Alle fraksjonene ble oppkonsentrert ved hjelp av rotavapor. Deretter ble ca 30 µl av alle fraksjonene applisert på 3 omvendtfase TLC-plater. Fraksjon 1-9 ble utviklet med MeOH:vann (20:80), fraksjon 10-14 ble utviklet med MeOH:vann (40:60) og fraksjon 17-23 ble utviklet med MeOH:vann (60:40). Etter endt utvikling ble platene observert ved kort- og langbølget UV-lys. Kolonnefraksjonene ble samlet til 5 nye fraksjoner.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-2	EtOAc, v1-2,s1,s1,v1
3-5	EtOAc, v1-2,s1,s1,v2
6-9	EtOAc, v1-2,s1,s1,v3
10-18	EtOAc, v1-2,s1,s1,v4
19-23	EtOAc, v1-2,s1,s1,v5

5.4.5.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene og ^{13}C og HMQC av fraksjon 1 ved hjelp av Gemini-200 (200 MHz for ^1H , 50 MHz for ^{13}C) og Bruker DPX300. Alle prøvene var løst i deuterert MeOH.

5.4.5.3 DPPH-scavenging og XO-hemming

Det ble målt DPPH-scavenging- og XO-aktivitet av EtOAc, v1-2,s1,s1,v1. Se kap. 5.3.3 og kap. 5.3.4.

5.4.5.4 Acetylering av EtOAc, v1-2,s1,s1,v1

66 mg av EtOAc, v1-2,s1,s1,v1 ble tatt ut, løst i 2 ml pyridin og tilsatt 2 ml eddiksyreanhydrid. Blandingen stod i romtemperatur i ca ett døgn slik at acetylerbare grupper i fraksjonen skulle bli acetylet. Deretter ble innholdet dampet til tørrhet på vakuum og blåst med nitrogengass. For å bekrefte at en reaksjon hadde funnet sted ble litt av stoffet påført en omvendtfase TLC-plate og utviklet med MeOH:vann

(50:50). Deretter ble fraksjonen løst i ca 10 ml MeOH:vann (20:80) og applisert på en omvendtfase kolonne (20x120 mm). Totalt 14 fraksjoner à 30 ml ble samlet.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-5	MeOH:vann (20:80)	Ca 150 ml
6-10	MeOH:vann (50:50)	Ca 150 ml
10-14	MeOH	Ca 150 ml

5.4.5.5 Analytisk HPLC

Det ble kjørt analytisk HPLC av fraksjon 2-14. Metode 4, s. 90.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
3-4	EtOAc, v1-2,s1,s1,v1,A-RP1
11	EtOAc, v1-2,s1,s1,v1,A-RP4
12	EtOAc, v1-2,s1,s1,v1,A-RP5
13	EtOAc, v1-2,s1,s1,v1,A-RP6

5.4.5.6 NMR

Det ble tatt ^1H - og ^{13}C -spektra av alle fraksjonene. Prøvene ble løst i deuterert MeOH. Deretter ble prosedyren gjentatt for en like stor del av EtOAc, v1-2,s1,s1,v1. Totalt 24 fraksjoner ble samlet. Fraksjon 1-18 ble samlet i 20 ml dramglass, fraksjon 19-23 i 30 ml dramglass og fraksjon 24 ble samlet separat.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-5	MeOH:vann (20:80)	Ca 100 ml
6-10	MeOH:vann (50:50)	Ca 100 ml
11-21	MeOH	Ca 250 ml
22-24	Aceton	Ca 100 ml

5.4.5.7 Analytisk HPLC

Deretter ble alle fraksjonene analysert ved hjelp av analytisk HPLC. Metode 4, s. 90.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
2	EtoAc, v1-2,s1,s1,v1,A- RP1(2)
3-5	EtoAc, v1-2,s1,s1,v1,A- RP4(2)
18-19	EtoAc, v1-2,s1,s1,v1,A- RP5(2)
22-24	EtoAc, v1-2,s1,s1,v1,A- RP6(2)

5.4.5.8 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene som ble løst i deuterert MeOH.

5.4.6 MCI gel kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2,s4

Reagenser

Metanol

Destillert vann

Utstyr

Stativ

Kolonne (15cm x 2,5cm)

Pumpe FMI RP-G150

Dramglass, 30 ml

Utførelse

MCI-gelen ble rørt ut i ca 100 ml MeOH:vann (20:80) og satt til svelling i 2 døgn.

Gelen ble deretter overført til kolonnen. EtOAc, v1-2, s4 ble løst i ca 10 ml

MeOH:vann (40:60) og applisert på kolonnen. Deretter ble korken (som var festet til

slangen fra pumpen) festet til kolonnen og mobilfase ble pumpet inn i den. Totalt 13 fraksjoner à 30 ml ble samlet.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-2	MeOH:vann (20:80)	Ca 50 ml
3-4	MeOH:vann (50:50)	Ca 50 ml
5-13	MeOH	Ca 200 ml

5.4.6.1 Analytisk TLC

15 µl av alle fraksjonene ble applisert på en omvendtfase tynnsljiktplate. MeOH:vann (60:40) tilsatt noen dråper eddiksyre ble benyttet som løpemiddel. Etter endt utvikling ble platen tørket og observert ved kort- og langbølget UV-lys.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-4	EtOAc, v1-2,s4,m1
5	EtOAc, v1-2,s4,m2
6	EtOAc, v1-2,s4,m3
7	EtOAc, v1-2,s4,m4
8	EtOAc, v1-2,s4,m5
9-10	EtOAc, v1-2,s4,m6
11-13	EtOAc, v1-2,s4,m7

5.4.6.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene. Alle prøvene ble løst i deuterert MeOH. I tillegg ble det tatt ^1H -spekter av autentisk scopoletin.

5.4.6.3 Analytisk HPLC

Alle 7 fraksjonene ble analysert ved hjelp av analytisk HPLC. Metode 1, s. 89 ble benyttet. I tillegg ble scopoletin analysert med HPLC, samme metode ble benyttet.

5.4.6.4 DPPH-scavenging og XO-hemming

Det ble målt DPPH-scavengingeffekt av EtOAc, v1-2,s4,m2 og m5 og XO-effekt av EtOAc, v1-2,s4,m2 og m5-m6. Se side 17-18.

5.4.7 Preparativ HPLC EtOAc, v1-2,s4,m3

EtOAc, v1-2, s4, m3 ble løst i 2 ml MeOH:vann (30:70), filtrert og injisert på preparativ HPLC, metode 5, s. 90. Mobilfasehastigheten var 10 ml/min. Fraksjonene ble samlet i totalt 16 dramglass à 20 ml. Hver topp som ble detektert ble samlet separat.

5.4.7.1 Analytisk HPLC etter preparativ

Alle 16 fraksjonene fra preparativ HPLC ble analysert ved hjelp av analytisk HPLC. Metode 2, s. 89 ble benyttet.

5.4.7.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av EtOAc, v1-2, s4, m3, prep8 og prep9 som var løst i deuterert MeOH. Det ble også gjort flere forsøk med forskjellige ^{13}C -spektra.

5.5 Arbeid med BuOH-fraksjonene

5.5.1 Versaflash kolonnekromatografi av BuOH-E

Versaflashkolonnen (80x300 mm) ble kondisjonert med ca 600 ml MeOH:vann (10:90). Ca 9 g av BuOH-E ble løst i ca 40 ml MeOH og filtrert før det ble applisert på kolonnen. Det ble samlet totalt 84 fraksjoner à ca 50 ml. Fraksjonene etter 84 ble samlet i en stor kolbe.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-18	MeOH:vann (10:90)	Ca 900 ml
19-28	MeOH:vann (20:80)	Ca 500 ml
29-41	MeOH:vann (40:60)	Ca 650 ml
42-51	MeOH:vann (60:40)	Ca 500 ml
52-66	MeOH:vann (80:20)	Ca 750 ml
67-79	MeOH	Ca 650 ml
80-84	Aceton:vann (70:30)	Ca 250 ml

5.5.1.1 Analytisk TLC

De fraksjonene som hadde farge ble påsatt omvendtfase TLC-plater. Fraksjon 6, 11, 19, 23, 29, 34, 41 ble utviklet med MeOH:vann (40:60) tilsatt noen dråper eddiksyre. Fraksjon 41, 50, 55, 60, 67, 74, 83 ble utviklet med MeOH:vann (70:30) tilsatt noen dråper eddiksyre. Etter endt eluering ble platene tørket og betraktet ved kort- og langbølget UV-lys for deretter å bli sprayet med ceric-reagens og plassert i varmeskap (100°C) i 15 minutter.

Kolonnefraksjoner	Fraksjon
1-4	BuOH, v1
5-10	BuOH, v2
11-18	BuOH, v3
19-28	BuOH, v4
29-39	BuOH, v5
40-49	BuOH, v6
50-53	BuOH, v7
54-63	BuOH, v8
64-72	BuOH, v9
73-84	BuOH, v10

5.5.1.2 NMR-spektroskopi

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene og ^{13}C av fraksjon 2 og 4 ved hjelp av Gemini-200 (200 MHz for ^1H , 50 MHz for ^{13}C). Prøvene ble løst i deuterert MeOH.

5.5.1.3 DPPH-spraying

En liten mengde av alle fraksjonene ble applisert på og sprayet med en kraftig DPPH-løsning, ca 40 mg/ml. V2-6 ble raskt lysegule. De andre fraksjonene brukte noe lenger tid på å endre farge. Deretter ble det målt DPPH-scavengingeffekt av BuOH, v5 og v6. Se kap. 5.3.3.

5.5.2 Sephadex LH20 kolonnekromatografi av BuOH v2-3

BuOH-v2 og BuOH-v3 ble slått sammen, løst i ca 15 ml MeOH:vann (50:50), og applisert på kolonnen. Fra og med 220 ml ble fraksjoner samlet i 60 ml merkede dramglass.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-7	MeOH:vann (33,3: 66,7)	Ca 450 ml
8-13	MeOH:vann (50:50)	Ca 350 ml
14-18	MeOH	Ca 300 ml

5.5.2.1 Analytisk TLC

Alle fraksjonene ble applisert på en omvendtfase TLC-plate, og utviklet med MeOH:vann (40:60) tilsatt noen dråper eddiksyre. Etter at TLC-platen hadde tørket ble den observert i kort- og langbølget UV. Totalt 18 fraksjoner ble slått sammen til syv.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-2	BuOH, v2-3,s1
3	BuOH, v2-3,s2
4	BuOH, v2-3,s3
5-7	BuOH, v2-3,s4
8-10	BuOH, v2-3,s5
11-13	BuOH, v2-3,s6
14-18	BuOH, v2-3,s7

5.5.2.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene og ^{13}C -spektra av fraksjon 4-7 ved hjelp av Gemini-200 (200 MHz for ^1H , 50 MHz for ^{13}C). Alle prøvene ble løst i deuterert MeOH.

5.5.2.3 DPPH-scavenging

Det ble målt DPPH-scavengingeffekt av BuOH, v2-3,s2 og s3. Se kap 5.3.3.

5.5.2.4 XO-hemming

Det ble målt XO-hemmende aktivitet av BuOH, v2-3,s3. Se kap. 5.3.4.

5.5.3 Sephadex LH20 kolonnekromatografi av BuOH v2-3, s4

BuOH, v2-3, s4 ble oppløst i MeOH:vann (40:60) og applisert på den ferdigkondisjonerte Sephadex LH20-kolonnen (500 ml MeOH:vann (10:90)) som tidligere beskrevet. De første 220 ml ble samlet separat. Totalt 29 fraksjoner à 60 ml ble samlet.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-4	MeOH:vann (10:90)	Ca 250 ml
5-8	MeOH:vann (20:80)	Ca 250 ml
9-12	MeOH:vann (35:65)	Ca 250 ml
13-16	MeOH:vann (50:50)	Ca 250 ml
17-20	MeOH:vann (75:25)	Ca 250 ml
21-24	MeOH	Ca 250 ml
25-27	Aceton:MeOH (50:50)	Ca 200 ml

5.5.3.1 Analytisk TLC

30 µl av alle fraksjonene ble applisert på omvendtfase TLC-plater. Fraksjon 1-6 ble utviklet med MeOH:vann (10:90), fraksjon 7-12 med MeOH:vann (25:75), fraksjon 13-20 MeOH:vann (60:40) og fraksjon 21-29 med MeOH:vann (80:20). Etter at platene var ferdigutviklet og tørket ble de observert i kort- og langbølget UV-lys. De fraksjonene som så like ut ble slått sammen. Fraksjon BuOH, v2-3,s4,s3 ble knust i rotavaporen, og kun en liten del av stoffet var tilgjengelig etter uhellet.

1-4	BuOH, v2-3,s4,s1
5-6	BuOH, v2-3,s4,s2
7	BuOH, v2-3,s4,s3
8	BuOH, v2-3,s4,s4
9-12	BuOH, v2-3,s4,s5
13-14	BuOH, v2-3,s4,s6
15-16	BuOH, v2-3,s4,s7
17-20	BuOH, v2-3,s4,s8
21-24	BuOH, v2-3,s4,s9
25-26	BuOH, v2-3,s4,s10

5.5.3.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene og ^{13}C -spektra av fraksjon 3-4 ved hjelp av Gemini-200 (200 MHz for ^1H , 50 MHz for ^{13}C) Fraksjon 1-7 ble løst i deuterert metanol. Fraksjon 8-10 ble løst i deuterert aceton.

5.5.3.3 DPPH-scavenging og XO-hemming

Det ble målt DPPH-scavenging- og XO-effekt av BuOH, s2-3,s4,s2 og s4. Se kap. 5.3.3 og 5.3.4.

5.5.4 Versaflash kolonnekromatografi av BuOH, v2-3,s4,s2

Reagenser

MeOH tilsatt 1 % eddiksyre

Destillert vann tilsatt 1 % eddiksyre

Utstyr

Versaflash-apparat med tilhørende utstyr

Versapak C_{18} -kolonne 40x150 mm

Dramglass 60 ml

Begerglass, 500 ml

Utførelse

Kolonnen ble kondisjonert med 500 ml MeOH:vann (10:90) tilsatt 1% eddiksyre. BuOH, v1-2, s4, s2 ble løst i ca 7 ml MeOH:vann (30:70), filtrert og applisert på kolonnen. De første 100 ml ble samlet separat. Totalt 23 fraksjoner à 60 ml ble samlet.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-4	MeOH:vann (10:90)	Ca 250 ml
5-11	MeOH:vann (40:60)	Ca 500 ml
12-15	MeOH:vann (70:30)	Ca 250 ml
16-23	MeOH	Ca 500 ml

5.5.4.1 Analytisk TLC

Fraksjonene ble oppkonsentrert på rotavapor. Etter oppkonsentrering ble ca 40 µl av alle fraksjonene påført omvendtfase tynnsjiktplater, utviklet med MeOH:vann (40:60), tørket, observert i kort- og langbølget UV-lys, og sprayet med ceric-reagens. Ut i fra dette ble fraksjonene slått sammen som vist:

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1	BuOH, v2-3,s4,s2,v1
2-4	BuOH, v2-3,s4,s2,v2
5-6	BuOH, v2-3,s4,s2,v3
7-8	BuOH, v2-3,s4,s2,v4
9	BuOH, v2-3,s4,s2,v5
10-16	BuOH, v2-3,s4,s2,v6
17-23	BuOH, v2-3 s4,s2,v7

5.5.4.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene og ^{13}C -spektra av fraksjon 1, 2 og 4. Fraksjon 1-4 ble løst i deuterert MeOH, fraksjon 5-7 ble løst i deuterert aceton.

5.5.5 Preparativ HPLC av BuOH, v2-3,s4,s2,v1

Fraksjonen ble løst i 2 ml MeOH:vann (20:80) og filtrert med Millex Millipore 0,20 µm. Prøven ble delt i 2 og hver del kromatografert for seg. Metode 6 ble benyttet, s. 91. Mobilfasehastigheten ble satt til 20 ml/min. Første 20 ml gikk i eget glass. De neste fraksjonene ble samlet i 20 ml reagensglass merket 1-160. Mellom 1-5 ml mobilfase ble samlet per reagensglass. Detekterte topper ble samlet separat.

5.5.5.1 NMR

Det ble tatt ^1H NMR av alle fraksjonene som var løst i deuterert MeOH.

5.5.5.2 DPPH-scavenging og XO-hemming

Det ble målt DPPH-scavenging- og XO-effekt av BuOH, v2-3,s4,s2,v2. Se kap 5.3.3 og 5.3.4.

5.5.6 MCI gel kolonnekromatografi av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4 (1)

Reagenser

Metanol

Destillert vann

Utstyr

Stativ

Kolonne (15cm x 2,5cm)

Pumpe FMI RP-G150

Dramglass, 30 ml

Utførelse

BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4 ble løst i MeOH og dampet til tørrhet på rotavapor ved 50 °C. Kolonnen ble kondisjonert med ca 150 ml MeOH:vann (20:80). BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4 ble løst i ca 10 ml MeOH:vann (20:80). 5ml ble applisert på kolonnen. Deretter ble pumpen koblet til kolonnen og mobilfase ble pumpet gjennom den. Totalt 8 fraksjoner à 30 ml ble samlet.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-2	MeOH:vann (20:80)	Ca 50 ml
2-3	MeOH:vann (30:70)	Ca 25 ml
4-5	MeOH:vann (50:50)	Ca 60 ml
6-8	MeOH	Ca 100 ml

5.5.6.1 Analytisk TLC

Ca 30 µl av alle fraksjonene ble applisert på en omvendtfase tynnsjiktplate og eluert med MeOH:vann (50:50) tilsatt noen dråper eddiksyre. Etter endt utvikling ble platen observert i lang- og kortbølget UV-lys. Ut i fra dette ble fraksjonene slått sammen som vist:

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-3	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m1
4-5	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m2
6	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3
7	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m4
8	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m5

5.5.6.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene, og ^{13}C av fraksjon 2 ved hjelp av Gemini-200 (200 MHz for ^1H , 50 MHz for ^{13}C). Prøvene ble løst i deuterert MeOH.

5.5.6.3 Analytisk HPLC

For å se om noen av fraksjonene egnet seg for preparativ HPLC ble BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m1 og m2 analysert med HPLC. Metode 1 ble benyttet, s. 89.

5.5.6.4 DPPH-scavenging og XO-hemming

Det ble målt DPPH-scavenging- og XO-effekt av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m4. Se kap. 5.3.3 og 5.3.4.

5.5.6.5 MCI gel av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4(2)

Samme prosedyre ble gjentatt for andre halvdel av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4, men etter ferdigutvikling av tynnsjiktplaten ble fraksjonene delt opp i 7 og ikke 5 fraksjoner.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-3	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4, m1(2)
4	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4, m2(2)
5	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4, m3(2)
6	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4, m4(2)
7	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4, m5(2)
8-9	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4, m6(2)
10-13	BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4, m7(2)

5.5.6.6 Analytisk HPLC

Det ble tatt flere analyser av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m1-5(2) på analytisk HPLC for å se om noen av prøvene egnet seg for preparativ HPLC. Metode 1, s. 89.

5.5.6.7 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene som ble løst i deuterert MeOH.

5.5.7 Preparativ HPLC av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2)

På bakgrunn av analytisk HPLC ble det lagd en tilsvarende metode for preparativ HPLC og BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2) ble applisert på apparatet. Det ble samlet totalt 15 fraksjoner à ca 10 ml. Mobilfasehastigheten var 10 ml/min. Hver topp som ble detektert ble samlet separat. Etter endt preparativ HPLC ble alle 15 fraksjonene analysert med analytisk HPLC. Metode 5, s. 90.

5.5.7.1 Analytisk HPLC av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3

Fraksjonen ble analysert med HPLC. Metode 3 ble benyttet, s. 90.

5.5.7.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spekter og ^{13}C , DEPT135, HMQC og COSY av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),hplc3. Prøven ble løst i deuterert MeOH.

5.5.7.3 Massespektrometri

Massen til BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3 ble undersøkt med massespektrometer av Steven Wilson, Kjemisk institutt, UiO.

5.6 Arbeid med DCM-fraksjonene

5.6.1 Versaflash kolonnekromatografi av DCM-E – normalfase

Reagenser

Diklormetan

Heksan

Etylacetat

Aceton

Utstyr

Versaflash-apparat med tilhørende utstyr

Versapak normalfasekolonne (80x300 mm)

Dramglass 60 ml

Utførelse

Versapakkolonnen ble kondisjonert med 800 ml heksan:diklormetan (50:50). DCM-E (12,72g) ble løst i ca 50 ml diklormetan og filtrert. Ca 40 ml av løsningen ble påført kolonnen. Totalt 47 fraksjoner à 60 ml ble samlet. De første 400 ml ble samlet separat.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
0-1	Heksan:DCM (30:70)	Ca 500 ml
2-8	DCM	Ca 400ml
9-12	EtOAc	Ca 250 ml
13-47	Aceton	Ca 2 000 ml

5.6.1.1 Analytisk TLC

Ca 20 µl av hver fraksjon ble påført en normalfase Kiesel gel 60 F254 plate.

Fraksjon 1-20 ble utviklet med EtOAc:DCM (37,5:62,5). Fraksjon 21-47 ble utviklet med aceton. Etter endt utvikling ble platene tørket og observert i kort- og langbølget UV-lys. Deretter ble platene sprayet med ceric-reagens og oppvarmet i 15 minutt ved ca 100 °C. Kolonnefraksjonene ble slått sammen til større fraksjoner på bakgrunn av TLC og bedømmelse av farge. Deretter ble fraksjonene dampet til tørrhet med rotavapor ved 40 °C og satt på oljepumpe i 15-30 minutter.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1	DCM, v0
2-8	DCM, v1
9-14	DCM, v2
15-16	DCM, v3
17-18	DCM, v4
19-20	DCM, v5
21-30	DCM, v6
31-47	DCM, v7

5.6.1.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene ved. Prøvene ble løst i deuterert kloroform.

5.6.2 Versaflash kolonnekromatografi av DCM, v3

DCM, v3 ble løst i 10 ml DCM, 1 ml ble tatt ut for senere bruk. Resten ble filtrert (S&S594) og applisert på en ferdigkondisjonert (heptan) versapak normalfase sfærisk silikakolonne (40x150 mm). Filteret ble skrapet fritt for uløst stoff og deretter ble filteret ekstrahert med ca 50 ml aceton. Fraksjon 1-22 ble samlet i dramglass à 20 ml, fraksjon 23-33 à 30 ml dramglass og fraksjon 34-52 à 60 ml dramglass.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-10	Heptan	Ca 200 ml
11-15	Heptan:DCM (90:10)	Ca 100 ml
16-22	Heptan:DCM (50:50)	Ca 150 ml
23-32	DCM	Ca 300 ml
33-34	DCM:EtOAc (95:5)	Ca 100 ml
35-36	DCM:EtOAc (85:15)	Ca 100 ml
37-39	DCM:EtOAc (50:50)	Ca 150 ml
40-44	EtOAc	Ca 300ml
45	EtOAc:Aceton (50:50)	Ca 50 ml
46-49	Aceton	Ca 150 ml
50-52	Heptan	Ca 200 ml

5.6.2.1 Analytisk TLC

De mest interessante fraksjonene ble applisert på normalfase tynnsjiktplater, betraktet ved kort og langbølget UV-lys og bedømt ut ifra løklukt. Etterpå ble platen sprayet med ceric-reagens og inkubert ved 105 °C i 5 minutter. På bakgrunn av dette ble fraksjonene slått i sammen til 10 nye fraksjoner.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-15	DCM, v3,v1
16-19	DCM, v3,v2
20-33	DCM, v3,v3
34-38	DCM, v3,v4
39-44	DCM, v3,v5
45-46	DCM, v3,v6
47	DCM, v3,v7
48	DCM, v3,v8
49	DCM, v3,v9
50-52	DCM, v3,v10

5.6.2.2 NMR

Fraksjon 2 og 5 ble løst i deuterert kloroform. Fraksjon 6-7 ble løst i deuterert aceton.

Det ble tatt ^1H -spektra av fraksjon 2, 5-7, og ^{13}C av fraksjon 5-7.

5.6.2.2 DPPH-scavenging

Det ble målt DPPH-scavengingeffekt av DCM, v3,v6. Se kap. 5.3.3.

5.6.2.3 XO-hemming

Det ble målt XO-hemmende effekt av DCM, v3,v7. Se kap. 5.3.4.

5.6.3 Versaflash kolonnekromatografi av DCM, v4

DCM, v4 ble løst i ca 20 ml DCM: EtOAc (50:50). 2 ml ble tatt ut for senere bruk.

Resten av ekstraktet ble filtrert (S&S594) og applisert på samme kolonne som for DCM, v3. Kolonnen ble kondisjonert med DCM. Filteret ble skrappt fritt for uløst stoff og deretter ble filteret ekstrahert med 50 ml aceton.

Fraksjon 1-11 à 20 ml, fraksjon 12-33 à 30 ml og fraksjon 34-47 à 60 ml.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-18	DCM:EtOAc (50:50)	Ca 400 ml
19-31	EtOAc	Ca 400 ml
32-37	EtOAc:Aceton (50:50)	Ca 300 ml
38-42	Aceton	Ca 300 ml
43-47	DCM	Ca 300 ml

5.6.3.1 Analytisk TLC

De mest interessante fraksjonene ble applisert på normalfase tynnsjiktplater, betraktet ved kort og langbølget UV-lys og bedømt ut ifra løklukt. På bakgrunn av dette ble fraksjonene slått i sammen til 8 nye fraksjoner.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-2	DCM, v4,v1
3-7	DCM, v4,v2
8-20	DCM, v4,v3
21-26	DCM, v4,v4
27-32	DCM, v4,v5
33-38	DCM, v4,v6
39-43	DCM, v4,v7
44-47	DCM, v4,v8

5.6.3.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av fraksjon 3-8 og ^{13}C -spektrum av fraksjon 6.

5.6.4 HPLC av DCM, v4, v3

DCM, v4, v3 ble løst i 1,5ml MeOH, filtret og applisert på preparativ HPLC. Metode 5, s. 90 ble benyttet. Totalt 13 fraksjoner à ca 10 ml ble samlet. For å bekrefte

innholdet i fraksjonene ble det tatt analytisk HPLC av fraksjon 2 og 9-10. Metode 4, s. 90 ble benyttet.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
2	DCM, v4,v3,prep1
9-10	DCM, v4,v3,prep2

5.6.4.1 NMR

Det ble tatt ^1H - og ^{13}C -spektra av fraksjon 1 og 2. Prøvene ble løst i henholdsvis deuterert kloroform og tungtvann.

5.6.4.2 Ferulasyre

Ferulasyre ble analysert på HPLC, metode 4, s. 90. Deretter ble det tatt ^1H -spekter av ferulasyre løst i deuterert MeOH. DPPH-radikalfangende- og XO-hemmende effekt ble også undersøkt.

5.6.5 RP18 kolonnekromatografi av DCM, v4,v6

Basert på NMR-data ble DCM, v4,v6 valgt som kandidat for videre arbeid.

Fraksjonen ble løst i ca 3 ml MeOH:vann (15:85) og applisert på en ferdigkondisjonert RP18 kolonne (17x160 mm). Totalt 11 fraksjoner à ca 10 ml ble samlet.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-2	MeOH:vann (15:85)	Ca 15 ml
2-3	MeOH:vann (40:60)	Ca 15 ml
4-5	MeOH:vann (70:30)	Ca 20 ml
6-7	MeOH	Ca 20 ml
8-9	MeOH:acetone (50:50)	Ca 25 ml
10-11	Aceton	Ca 20 ml

5.6.5.1 Analytisk HPLC

Det ble utført analytisk HPLC av utvalgte fraksjoner slik at de kunne slås sammen til større fraksjoner. Metode 4 ble benyttet, s. 90.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1	DCM, v4,v6,rp1
2-5	DCM, v4,v6,rp2
6-8	DCM, v4,v6,rp3
9-11	DCM, v4,v6 rp4

5.6.5.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene og ^{13}C -spektra av fraksjon 1 og 2. Prøvene ble løst i deuterert aceton. I tillegg ble det tatt HMQC-, COSY- og DEPT-135-spekter av DCM, v4,v6,rp1.

5.6.5.3 DPPH-scavenging og XO-hemming

Det ble målt DPPH-scavenging- og XO-hemmende effekt av DCM, v4,v6,rp2. Se kap. 5.3.3 og 5.3.4.

5.6.6 RP18 kolonnekromatografi av DCM, v4,v6,rp1

DCM, v4, v6, rp1 ble løst i ca 3 ml MeOH (50:50) og applisert på den ferdigkondisjonerte (MeOH:vann (2:98)) kolonnen (17x160 mm). Totalt 11 fraksjoner ble samlet. De første 10 ml ble samlet separat, fraksjon 1-9 à 5 ml og 10-11 à 10 ml.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-3	MeOH:vann (2:98)	Ca 15 ml
4-6	MeOH:vann (10:90)	Ca 15 ml
7-8	MeOH:vann (50:50)	Ca 10 ml
9-11	Aceton	Ca 20 ml

5.6.6.1 Analytisk HPLC

Alle fraksjonene ble undersøkt ved analytisk HPLC og på bakgrunn av dette ble kolonnefraksjonene slått sammen til større fraksjoner. Metode 4, s. 90 ble benyttet.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
2-3	DCM, v4,v6, rp1,rp1
4-6	DCM, v4,v6, rp1,rp2
7-9	DCM, v4,v6, rp1,rp3
10-11	DCM, v4,v6, rp1,rp4

5.6.6.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene og ^{13}C -spektra av fraksjon 1 og 4. Prøvene ble løst i deuterert MeOH. For bedre å kunne sammenligne tidligere prøver ble DCM, v4,v6,rp1,rp1 også løst i deuterert aceton.

5.6.6.3 DPPH-scavenging

Det ble målt DPPH-scavengingeffekt av DCM, v4,v6,rp1,rp2. Se kap. 5.3.3.

5.6.7 Versaflash kolonnekromatografi DCM, v5

En versapak normalfase sfærisk silikakolonne (40x150mm) ble kondisjonert med ca 200 ml pentan:DCM (50:50). DCM, v5 ble løst i ca 20 ml DCM, filtrert (S&S594) og applisert på kolonnen. Totalt 42 fraksjoner à 50 ml ble samlet

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-8	Pentan:DCM (50:50)	Ca 400 ml
9-16	DCM	Ca 400 ml
17-24	EtOAc	Ca 400 ml
25-32	Aceton:EtOAc (66,7:33,3)	Ca 400 ml
33-35	Aceton:Isopropanol (50:50)	Ca 200 ml
36-42	Isopropanol	Ca 400 ml

5.6.7.1 Analytisk TLC

Det ble applisert ca 20 µl av noen få utvalgte fraksjoner og utviklet på omvendtfase tynnsjiktplater. På bakgrunn av fargen på fraksjonene etter Versaflashsepareringen og TLC ble kolonnefraksjonene slått sammen til fem nye fraksjoner.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-19	DCM, v5,v1
20-21	DCM, v5,v2
22-32	DCM, v5,v3
33-35	DCM, v5,v4
36-42	DCM, v5,v5

Fraksjon DCM, v5,v3 og v5 samt et ukjent antall andre fraksjoner ble ødelagt i en eksplosjon på laben.

5.6.7.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av fraksjon 1, 2 og 4. Fraksjon 1-2 ble løst i deuterert kloroform. Fraksjon 4 ble løst i deuterert aceton.

5.6.8 HPLC av DCM, v5,v1

Det ble gjort preparativ HPLC av DCM, v5,v1. Totalt 8 fraksjoner ble samlet à ca 10 ml. Metode 5, s. 90 ble benyttet. Analytisk HPLC, metode 4, s. 90 ble benyttet for å bekrefte innholdet i fraksjonene.

5.6.8.1 NMR

Det ble tatt ^1H -spekter av samtlige fraksjoner. Prøvene ble løst i deuterert metanol.

5.6.9 Versaflash kolonnekromatografi av DCM, v6

DCM, v6 ble løst i 20 ml EtOAc, filtrert (S&S594) og applisert på en ferdigkondisjonert (EtOAc) spherical normalfase silikakolonne (40x150 mm). Filteret ble ekstrahert med 50 ml aceton og samlet separat. Fraksjon 1-5 ble samlet à 30 ml, 6-27 à 60 ml. Totalt 27 fraksjoner ble samlet.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-10	EtOAc	Ca 450 ml
11-16	EtOAc:Aceton (50:50)	Ca 360 ml
17-24	Aceton	Ca 480 ml
25-27	Isopropanol	Ca 180 ml

5.6.9.1 Mengdevurdering på TLC-plate

Alle fraksjonene ble påsatt normalfase TLC-plate. Platen ble betraktet i kort- og langbølget UV-lys, sprayet med ceric-oppløsning og satt i varmeskap i 5 minutter ved 105 °C. På bakgrunn av dette ble kolonnefraksjonene slått sammen til 5 nye fraksjoner.

Kolonnefraksjon	Fraksjon
1-7	DCM, v6,v1
8-10	DCM, v6,v2
11-16	DCM, v6,v3
17-24	DCM, v6,v4
25-27	DCM, v6,v5

5.6.9.2 NMR

Det ble tatt ^1H - og ^{13}C -spektra av fraksjon 1-4. Alle prøvene ble løst i deuterert kloroform.

5.6.10 RP18 kolonnekromatografi av DCM v6,v1

En kolonne pakket med RP18 (17x160 mm) ble kondisjonert med MeOH:vann (10:90). DCM, v6,v1 ble løst i ca 4 ml MeOH:vann (20:80) og applisert på kolonnen. Totalt 13 fraksjoner à ca 10 ml ble samlet.

Fraksjon	Mobilfase	Mengde
1-2	MeOH:vann (10:90)	Ca 20 ml
3-4	MeOH:vann (40:60)	Ca 20 ml
5-6	MeOH:vann (70:30)	Ca 20 ml
7-9	MeOH	Ca 30 ml
10-13	Aceton	Ca 40 ml

5.6.10.1 Analytisk HPLC

Det ble tatt analytisk HPLC av alle fraksjonene. Metode 4, s. 90 ble benyttet. På bakgrunn av dette ble kolonnefraksjonene slått sammen til syv nye fraksjoner.

Kolonnefraksjon	Fraksjone
1-2	DCM, v6,v1,rp1
3-4	DCM, v6,v1,rp2
5-6	DCM, v6,v1,rp3
7	DCM, v6,v1,rp4
8	DCM, v6,v1,rp5
9	DCM, v6,v1,rp6
10-13	DCM, v6,v1,rp7

5.6.10.2 NMR

Fraksjonene ble løst i deuterert MeOH. Deretter ble det tatt ^1H -spektra av alle fraksjonene og ^{13}C -spektra av fraksjon 1, 4 og 7.

5.6.10.3 Polarimeter

Fraksjon DCM, v6,v1,rp1 ble løst i 2 ml metanol til en konsentrasjon på 6,5 mg/ml og deretter målt for optisk rotasjon på et polarimeter, (Perkin-Elmer 341).

5.6.11 Preparativ HPLC av DCM, v6,v1,rp3 og rp4

På bakgrunn av analytisk HPLC og NMR ble det kjørt preparativ HPLC av DCM, v6,v1,rp3 og DCM, v6,v1,rp4. Metode 5, s. 90 ble benyttet. Hver topp som ble detektert ble samlet separat.

5.6.11.1 Analytisk HPLC

Etter endt preparativ HPLC ble fraksjonene analysert med analytisk HPLC for å bekrefte innholdet. Metode 4, s. 90 ble benyttet. På bakgrunn av dette ble fraksjonene slått sammen til 3 nye. Vaniljesyre og isovaniljesyre ble analysert med HPLC metode 4, s. 90 ble benyttet.

5.6.11.2 NMR

Det ble tatt ^1H -spektra av alle prøvene. Prøvene ble løst i deuterert metanol. Det ble tatt NMR-spekter av vaniljesyre og isovaniljesyre.

5.7 Fullblodassay av DCM-E, EtOAc-E, BuOH-E, EtOAc v1-2,s1,s1,v1 og BuOH, v6

Reagenser

Humant blod fra 8 friske frivillige

Medium

Destillert vann

Phytohaemagglutinin (PHA)

70% etanol

Utstyr

Finnpipetter og spisser

Eppendorfrør

Reagensrør

Blodprøverør

Mikrotiterplater, Nunclon Surface

Hansker

LAF benk

Inkubator

Utførelse

Hendene ble vasket opp til albuen og desinfisert med etanol. Deretter ble inkubatoren og LAF-benken vasket med etanol. Blodprøve (ca. 2 ml per person) ble tatt fra 8 friske, frivillige. For å hindre koagulasjon ble blodprøverørene vendt opp ned med jevne mellomrom. 1 ml blod ble blandet med 9 ml medium. Løsningen ble blandet godt. Fortynningsrekke av planteekstraktene ble laget, se tabellen under.

Fortynningsrekke for ekstraktene.

Rør	Konsentrasjon (µg/ml)	
Rør 1	20 mg/ml	20 mg plantemateriale i 500 µl DMSO og 500 µl medium
Rør 2	10 mg/ml	200 µl medium + 200 µl fra rør 1
Rør 3	5 mg/ml	150 µl medium + 150 µl fra rør 2

Phytohaemagglutininløsningen (PHA) ble fortynnet ved å blande 600 µl medium med 600 µl PHA. 180 µl fortynnet blod ble tilsatt i hver brønn i mikrotiterplaten. 10 µl av medium ble tilsatt halvparten av brønnene og 10 µl PHA ble tilsatt andre halvdel. Kontrollbrønnen for mediumet ble tilsatt 20 µl medium, kontrollbrønnen for PHA ble tilsatt 10 µl medium og 10 µl PHA. Til slutt ble 10 µl av hver fortynning av planteekstraktene (2 paralleller av hver fortynning) tilsatt. Deretter ble platen ble satt til inkubering i 72 timer ved 37 °C. Etter endt inkubering ble ca 100 µl av supernatanten fra hver brønn i mikrotiterplaten overført til et merket eppendorfrør. Parallellene av hver fortynning ble slått sammen. Hele prosedyren ble gjentatt for hver bloddonor.

5.7.1 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

Reagenser

Destillert vann

Fangende antistoff: anti-humant IL-6 fra mus (2,0 µg/ml) i fosfatbufret saltvann (PBS)

Deteksjonsantistoff: anti-humant IL-6 fra geit (200 ng/ml) i fortynningsreagens

PBS: 1 tablett løst i 200 ml destillert vann

Streptavidin-HRP (pepperrot-peroksidase): fortynnet 1:200 i fortynningsreagens

Standard: Rekombinant humant IL-6 med konsentrasjoner 600, 300, 150, 75, 37,5, 18,75, og 9, 375 pg/ml i fortynningsreagens

Fortynningsreagens: 1,5 g Bovine Serum Albumin (BSA) og 150 ml PBS

Vaskebuffer: 500 ml 10 x PBS

PBS: 0,25 ml Tween 20

0,45 l destillert vann

0,2 g kaliumklorid (KCl)

0,2 g kaliumdihydrogenortofosfat (KH_2PO_4)

1,15 g dinatriumhydrogenortofosfat (Na_2HPO_4)

8,0 g natriumklorid (NaCl)

1 l destillert vann

Substratløsning: 2,5 ml av fargereagens A (H_2O_2)

2,5 ml av fargereagens B (tetrametylbendidin)

Stoppløsning: 5 ml svovelsyre (H_2SO_4)

95 ml destillert vann

Utstyr

Finnpipetter og spisser

Mikrotiterplate med 96 brønner

Begerglass

Liten bøtte

Magnetrører og magnet

Målesylinder

Reagensrør

Eppendorfrør

5.7.1.1 Klargjøring av mikrotiterplate

Dagen før ELISA-assaymetoden ble mikrotiterplaten dekket med antistoff. Fangende antistoff ble fortynnet til ønsket konsentrasjon (2,0 µg/ml) i PBS. Det ble tilsatt 50 µl fortynnet fangende antistoff i hver brønn. Lokket ble satt på og mikrotiterplaten ble inkubert over natt på et mørkt sted ved romtemperatur. Mikrotiterplaten ble vasket 3 ganger med vaskebuffer. Ved vaskeprosessen ble en liten bøtte fylt med vaskebuffer, mikrotiterplaten ble lagt i bøtta og ristet under væskeoverflaten. All væske som var i mikrotiterplaten ble fjernet grundig. Etter siste vask ble resterende vaskebuffer og bobler fjernet ved å snu mikrotiterplaten opp ned og tørket ved å banke platen mot rent, tørt papir. 300 µl fortynningsreagens ble tilsatt i hver brønn. Lokket ble satt på og platen ble inkubert på et mørkt sted i ca 1 time ved romtemperatur. Deretter ble platen vasket igjen som forklart tidligere.

5.7.1.2 ELISA-assay

50 µl av hver fortynning av prøven eller standarden (2 paralleller av hver fortynning) ble tilsatt brønnene. Lokket ble satt på og platen ble inkubert på et mørkt sted i 2 timer ved romtemperatur. Platen ble vasket som forklart tidligere. 50 µl deteksjonsantistoff ble tilsatt i hver brønn. Lokket ble satt på og platen ble inkubert på et mørkt sted i 2 time ved romtemperatur. Platen ble vasket som forklart tidligere. 50 µl Streptavidin-HRP ble tilsatt til hver brønn. Lokket ble satt på og platen ble inkubert på et mørkt sted i 20 minutter ved romtemperatur. Platen ble vasket som forklart tidligere. 50 µl substratløsning ble tilsatt til hver brønn. Lokket ble satt på og mikrotiterplaten ble inkubert på et mørkt sted i 20 minutter ved romtemperatur. 50 µl stoppløsning ble tilsatt til hver brønn. Mikrotiterplaten ble ristet forsiktig for å blande løsningen. Absorbansen ble målt ved 450 nm i en mikroplateleser.

6. Resultater og diskusjon

Forkortelser ved kromatografi

V = Versaflash

S = Sephadex LH20

M = MCI GEL

Prep = Preparativ HPLC

Rp = revers fase C₁₈

6.1 Ekstraksjon av plantemateriale

Ekstraksjonen av *T. alliacea* gav 2 forskjellige råekstrakt med ulike farge. DCM-E var brungult, boblete og seigt. MeOH-E var brungult til rødbrunt, mørkere enn DCM-E og seigt.

Løsningsmiddel	Vekt tørket plante (g)	Vekt råekstrakt (g)	Utbytte (%)
Diklormetan	473,9	12,72	2,7
Metanol	473,9	42,13	8,9

Ekstraksjonen med MeOH gav altså størst utbytte, mer enn 3 ganger høyere enn for DCM. Dette kan bety at planten inneholder mest polare stoff eller at de upolare stoffene satt fastere bundet til plantemateriale. Samme prosedyre ble benyttet ved begge løsningsmidlene men ekstraksjonen, med MeOH tok lengre tid.

6.1.1 NMR-spektroskopi DCM-E

¹H-spekteret av DCM-E viser at ekstraktet inneholder mye fett. 0,89 ppm (CH₃) 1,26 (CH₂). Toppene rundt 5,30 ppm kan komme fra olefiniske protoner og fra DCM. Toppene rundt 4 ppm kan komme fra glyseroldelen av fett. Siden NMR-prøven ble løst i CDCl₃ ser vi kloroformsignalet ved 7,27 ppm.

¹³C-spekteret av DCM-E viser mye av det samme som ¹H-spekteret. Signalet ved 14,1 ppm (CH₃) og signalene mellom ca 25-33 (CH₂) hører til fett. Signalet ved 62,1 ppm kan være fra O-substituert karbon. Signalene rundt 130 kan tilhøre sp²

hybridiserte karbonatomer (aromatiske eller dobbeltbindingskarbonatomer). (Se NMR-spektrum 1 og 2, s. 102).

6.1.2 NMR-spektroskopi MeOH-E

^1H -spekteret av MeOH-E viser at ekstraktet inneholder noe fett og aromatiske stoffer men mest sukker og vann. Signalet ved 1,29 ppm hører trolig til CH_2 fra fett. Området 3-4,5 ppm er typisk for karbohydrat. 3,35 ppm hører til metanol og 4,92 ppm hører til vann. 6,5-7,5 ppm er typisk for aromatiske stoffer og dobbeltbindingsprotoner.

^{13}C -spekteret av MeOH-E bekrefter ^1H -spekteret. Det er mange signaler mellom 60-80 ppm som kan høre til oksygenerte karbon fra karbohydrater. Det er også noen signaler som ligger rundt 95 ppm som kan høre til anomerkarboner i karbohydrater. (Se NMR-spektrum 3 og 4, s. 103).

6.1.3 XO-hemming

Det ble utført xantinoksidase-test på DCM-E og MeOH-E. Quercetin ble brukt som positiv kontroll.

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Hemming i %	SD	IC_{50}
DCM	167 $\mu\text{g/ml}$	33	6	-
MeOH	167 $\mu\text{g/ml}$	12	5	.
Quercetin	4,1 μM	77	1	1,6 \pm 0,4 μM
Quercetin	0,83 μM	32	9	

DCM-E var den mest aktive xantinoksidasehemmeren, men hemmingen steg ikke over 50 % ved den målte konsentrasjonen. Derfor ble ikke IC_{50} -verdier utregnet. IC_{50} -verdien er den konsentrasjonen som gir 50 % hemming. IC_{50} -verdien for quercetin, som ble benyttet som positiv kontroll, var 1,6 \pm 0,4 μM . Dette stemmer godt med tidligere rapportert verdi (Pham 2009).

6.1.4 DPPH-scavenging

Ekstrakt	Kons. i kyvette i µg/ml	Scavenget i %	SD
DCM	167	6,9	2,7
MeOH	167	9,9	0,6

Begge rækstraktene viser lav radikalscavengingeffekt. IC₅₀-verdien ble ikke beregnet siden aktiviteten av den målte konsentrasjonen ble for lav.

6.2 Videre arbeid

Ut ifra NMR-spektra, som gav inntrykk av at DCM-E inneholdt mest fett, mens MeOH-E inneholdt mer aromatiske og olefinsignaler, ble videre arbeid med MeOH-E prioritert.

6.2.1 Væske-væske ekstraksjon

MeOH-E ble separert ved hjelp av væske-væske ekstraksjon med EtOAc og BuOH.

Dermed ble de mest upolare stoffene igjen i EtOAc-fasen og de mest polare stoffene i vannfasen. Mellompolare stoffer ble fordelt i BuOH-fasen. Vannfasen begynte å skumme og var vanskelig å dampe inn. Dette kan komme av at fraksjonen inneholdt overflateaktive stoffer.

	Vekt i gram	Utbytte i % av rækstrakt
EtOAc-fase	5,52	13,1
BuOH-fase	9,77	23,2
Vannfase	22,35	53,0
Totalt	37,64	89,3

XO-hemming

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Hemming i %	SD	IC ₅₀
EtOAc-E	167 µg/ml	54	4	146 µg/ml
EtOAc-E	83,3 µg/ml	33	4	
BuOH-E	167 µg/ml	50	5	167 µg/ml
BuOH-E	83,3 µg/ml	22	2	
Vannekstrakt	167 µg/ml	5	7	-
Quercetin	4,1 µM	77	1	1,6 ± 0,4 µM
Quercetin	0,83 µM	32	9	

Denne testen ble utført samtidig som for MeOH-E og DCM-E, og derfor ble samme positive kontroll benyttet. Både EtOAc- og BuOH-ekstraktet viser betydelig høyere effekt enn MeOH-E. Dette kan forklares ved at de inaktive stoffene fra MeOH-E ble samlet i vannfasen ved væske-væske-ekstraksjonen, noe som bekreftes med at vannekstraktet er så godt som inaktivt. EtOAc-E er omtrent like aktivt som BuOH-E. Hemmingen i begge de aktive ekstraktene er konsentrasjonsavhengig, men betydelig lavere enn for quercetin.

6.2.2 DPPH-scavenging

Assay for radikalscavenging ble utført for alle fasene av MeOH-E. Resultatene er vist i tabellen under.

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Scavenging i %	SD
EtOAc-E	167 µg/ml	26,9	4,5
BuOH-E	167 µg/ml	15,1	0,4
Vannekstrakt	167 µg/ml	2,8	0,6

De inaktive stoffene har samlet seg i vannekstraktet, og de mest potente stoffene har samlet seg i EtOAc-E. Siden de mest upolare stoffene fra MeOH-E har gått over til EtOAc-E er det rimelig å anta at stoffene som har DPPH-scavengingaktivitet er

relativt upolare. Sammenlignet med den radikalfangende aktiviteten til MeOH-E er både BuOH-E og EtOAc-E mer aktivt.

6.2.3 NMR av BuOH-E

^1H -spekter av BuOH-fraksjonen viser metylgrupper rundt 1 ppm og CH_2 -grupper rundt 1,3 ppm som kan komme fra fett. Signalene rundt 4 ppm kan komme fra karbohydrater. Signaler fra 6,5-8,2 ppm kom sannsynligvis fra aromatiske grupper.

^{13}C -spekteret viste mye av det samme som ^1H -spekteret. Signalene rundt 20 ppm hører til metylgrupper, signalet rundt 38 ppm hører til CH_2 -grupper. Signalene rundt 60-80 ppm hører til deshielda karbonatomer, for eksempel C-O eller C-N. C-O kan komme fra sukker. Det ble tatt 64 pulser av prøven, noe som sannsynligvis ikke var nok for å få frem eventuelle aromatiske signal eller karbonyl-grupper. (Se NMR-spektrum 5 og 6, s. 104).

6.2.4 NMR av EtOAc-E

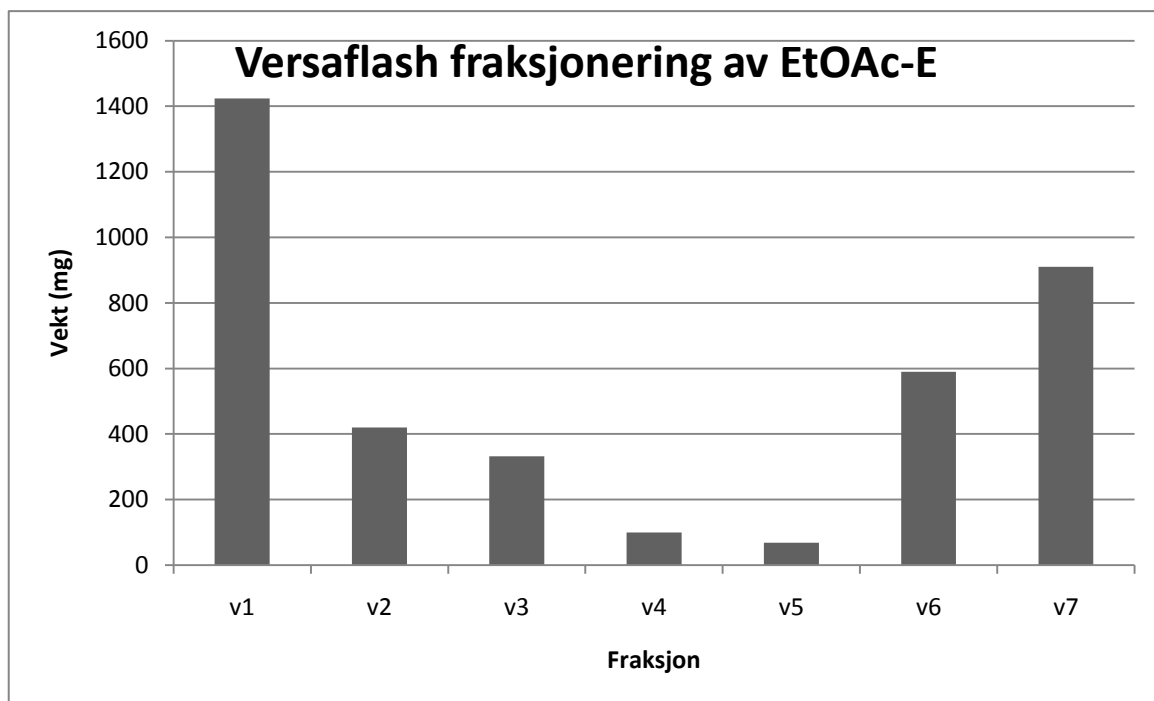
I ^1H -spekteret er signalet rundt 1 ppm trolig fra metylgrupper. Signalet ved 1,29 kommer fra CH_2 -grupper fra fett. Signalene mellom 3,5-4,5 kan komme fra karbohydrater eller svovelholdige molekyler. Signalene mellom 6-8 er typiske for aromat- og olefinområdet.

^{13}C -spekteret er i overstemmelse med ^1H -spekteret. Signalene fra 20-40 ppm kan høre til metyl- og metylengrupper fra fett. Toppene ved 30 og 210 ppm hører til aceton. Signalene ved 60-80 ppm kan komme fra deshielda karbonatomer fra f.eks sukker. Toppene rundt 130 ppm kan komme fra aromatiske/olefiniske grupper, og signalene rundt 170 kan komme fra karbonyl i ester- eller syregrupper. (Se NMR-spektrum 7 og 8, s. 105).

6.3 Versaflash kolonnekromatografi av EtOAc-E

EtOAc-E (5,52 g) ble separert ved kromatografi på en Versaflashkolonne som beskrevet i eksperimentelldelen kap 5.4.2. Kolonnen var ikke brukt tidligere. Etter at

NMR-spektra av EtOAc, v1-7 var tatt opp ble det klart at separasjonen ikke var helt vellykket. To store topper, ved 7,5 og 8,8 ppm, ble detektert på samtlige ^1H -spektra, men toppene var mest fremtredende i fraksjon v1 og v2. Dette er sannsynligvis forurensinger fra Versaflashkolonnen, siden disse toppene ikke fantes i rækstraktet. Fraksjon v1 og v2 ble slått sammen for videre arbeid i et håp om å finne ut hva forurensingen var.



Figur 1. Vekt av fraksjoner fra EtOAc-E.

6.3.1 DPPH-spraying av EtOAc, v1-7

En TLC-plate ble påført en liten mengde av alle fraksjonene og sprayet med en kraftig DPPH-løsning. V2, v3, v5 og v6 ble raskt lysegule. De andre fraksjonene brukte noe lenger tid på å endre farge og fargeendringen var ikke like kraftig. Jo raskere fargeendringen skjer, jo mer aktive kan en anta at fraksjonene er.

6.3.2 DPPH-scavenging

EtOAc, v1-2 ble ikke biologisk testet siden alt av stoffet ble brukt til videre separasjon.

Ekstrakt	Kons. i kyvette i µg/ml	Scavenget i %	SD
EtOAc, v3	167	29	1,0
EtOAc, v4	167	29	1,0
EtOAc, v5	167	24	1,0
EtOAc, v6	167	11,2	0,2
EtOAc, v7	167	3,1	0,5

Det er ganske lik aktivitet i v3-v5 og aktiviteten er tilnærmet lik som for EtOAc-E. Fraksjon v6 og v7 er mindre aktive enn de andre og ble ikke prioritert for videre arbeid. IC₅₀-verdien for alle fraksjonene er høyere enn 167 µg/ml.

6.3.3 XO-hemming

EtOAc, v1-2 ble ikke biologisk testet siden alt av stoffet ble brukt til videre separasjon.

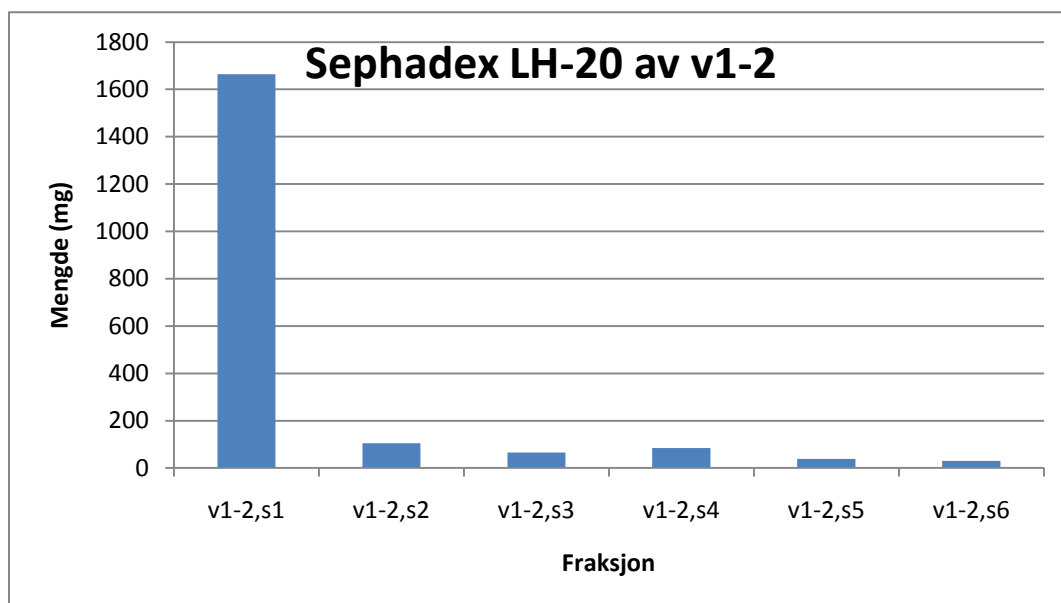
Ekstrakt	Kons. i kyvette	Hemming i %	SD	IC ₅₀
EtOAc, v3	167 µg/ml	41,4	8,9	-
EtOAc, v4	167 µg/ml	58,9	7,9	-
EtOAc, v5	167 µg/ml	55,9	5,2	-
EtOAc, v6	167 µg/ml	25,7	7,1	-
EtOAc, v7	167 µg/ml	19,8	7,6	-
Quercetin	4,1 µM	77	1	1,0 ± 0,1 µM
Quercetin	0,83 µM	32	9	

Quercetin ble igjen benyttet som positiv kontroll. Både fraksjon v4 og v5 har noe høyere aktivitet enn EtOAc-E. De andre fraksjonene har lavere aktivitet. IC₅₀-verdi ble ikke regnet siden aktiviteten var såpass nær råekstraktets verdi. Samtlige

fraksjoner har høyere aktivitet per vekt ved XO-hemming sammenlignet med DPPH-scavengingtesten.

6.3.4 Sephadex kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2

EtOAc, v1-2 (ca 1,85 g) ble applisert på en kolonne pakket med Sephadex LH20 som forklart i eksperimentelldelen kap 5.4.3.



Figur 2. Vekt av fraksjoner etter Sephadex kolonnekromatografi.

6.3.5 NMR av EtOAc, v1-2,s3-6

Spektra viser at disse fire fraksjonene er ganske ulike originalfraksjonen v1-2.

Kolonneforurensingen er borte og alle fire fraksjonene har mange signaler i aromatområdet. Fraksjon s3 har færre spesifikke topper i aromatområdet enn de andre fraksjonene, signalene kommer i klynger. I tillegg har fraksjon s3 signaler fra 4-4,7 ppm og flere topper fra 2-3 ppm som man ikke finner i de andre fraksjonene. Det er vanskelig å tolke disse signalene som bestemte strukturelementer, selv om O- og S-substituerte karboner kan komme i området 4-4,7 ppm. Singletten ved 3,88, som har høy intensitet i alle spektra, er sannsynligvis fra metoksygruppe. (Se NMR-spektrum 9-14 og 43, s. 106-108 og 123).

6.3.6 XO-hemming av EtOAc, v1-2,s2-6

EtOAc, v1-2,s1 ble benyttet for videre separasjon. Derfor ble denne fraksjonen ikke tatt med i biologiske tester. Disse fraksjonene ble testet samtidig som EtOAc, v3-7 og derfor ble samme positive kontroll (quercetin) benyttet.

Fraksjon	Kons. i kyvette	Hemming i %	SD	IC ₅₀
EtOAc, v1-2,s2	167 µg/ml	35,3	7,6	-
EtOAc, v1-2,s3	167 µg/ml	57,8	5,0	-
EtOAc, v1-2,s4	167 µg/ml	93,8	1,4	63 ± 7 µg/ml
EtOAc, v1-2,s4	41,7 µg/ml	31,6	2,4	
EtOAc, v1-2,s5	41,7 µg/ml	51,9	3,3	39 ± 5 µg/ml
EtOAc, v1-2,s5	16,7 µg/ml	25,2	6,4	
EtOAc, v1-2,s6	41,7 µg/ml	50,9	5,1	40 ± 12 µg/ml
EtOAc, v1-2,s6	16,7 µg/ml	28,5	14,4	
Quercetin	4,1 µM	77	1	1,0 ± 0,1 µM
Quercetin	0,83 µM	32	9	

Både fraksjon s5 og s6 viser betydelig hemming av XO. Fraksjon s4 har også høy aktivitet. Sammenlignet med EtOAc-E er aktiviteten av disse 3 fraksjonene betydelig høyere, noe som tyder på en oppkonsentrering av aktive stoffer. Dette kan også forklare at noen av EtOAc-fraksjonene har lavere aktivitet enn EtOAc-E.

6.3.7 DPPH-scavenging av EtOAc, v1-2,s2-6

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Scavenget i %	SD	IC ₅₀
EtOAc, v1-2,s2	167 µg/ml	61,9	0,9	109 ± 4 µg/ml
EtOAc, v1-2,s2	41,7 µg/ml	23,4	0,8	
EtOAc, v1-2,s3	167 µg/ml	65,5	0,4	97 ± 2 µg/ml
EtOAc, v1-2,s3	41,7 µg/ml	26,2	0,5	
EtOAc, v1-2,s4	83,3 µg/ml	76,7	0,8	50,6 ± 0,4 µg/ml
EtOAc, v1-2,s4	41,7 µg/ml	39,6	0,3	
EtOAc, v1-2,s5	83,3 µg/ml	88,5	0,3	43,1 ± 0,5 µg/ml
EtOAc, v1-2,s5	41,7 µg/ml	48,1	0,6	
EtOAc, v1-2,s6	41,7 µg/ml	68,0	0,6	21,0 ± 2 µg/ml
EtOAc, v1-2,s6	16,7 µg/ml	43,9	2,0	

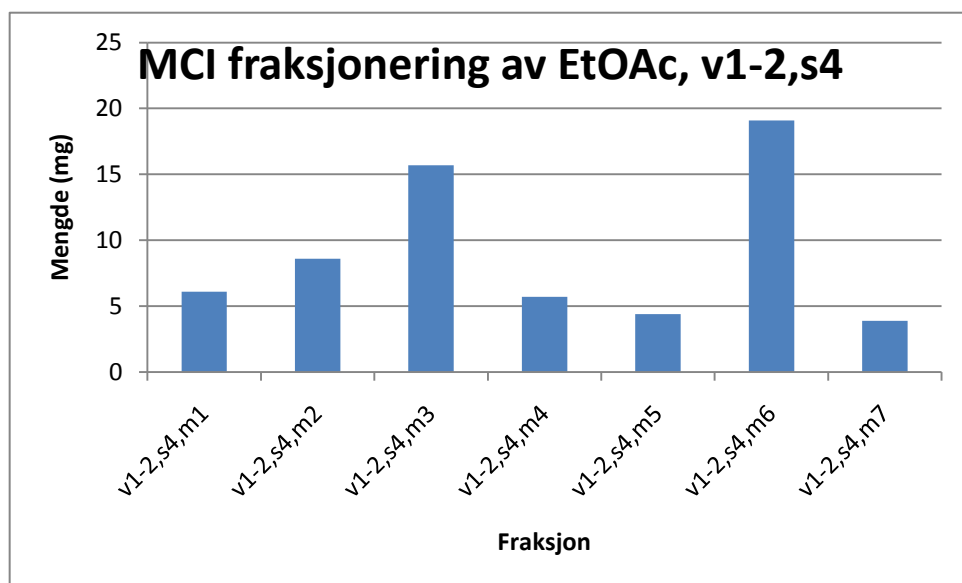
Alle fraksjonene, og spesielt s4-s6, har betydelig høyere DPPH-fangende aktivitet enn EtOAc-E. Som NMR-spekteret av s3 viser inneholder denne fraksjonen en større andel alifatiske komponenter og dermed mindre aromatiske komponenter enn s4-s6. Dette kan forklare at s4-s6 har høyest DPPH-fangende egenskaper. De fleste EtOAc-fraksjonene har til nå hatt høyere XO-hemmende effekt på vektbasis enn DPPH-fangende effekt, men for EtOAc, v1-2,s6 gjelder det motsatte. Denne fraksjonen er en dobbelt så effektiv radikalscavenger som den er en XO-hemmer. Noe av det samme observeres også med EtOAc, v1-2,s3, men denne fraksjonen er mindre potent.

På bakgrunn av NMR-data og biologiske tester ble EtOAc, v1-2, s4 prioritert for videre arbeid.

6.3.8 MCI GEL kolonnekromatografi av EtOAc, v1-2,s4

Denne fraksjonen veide 85 mg før den ble påsatt en kolonne pakket med MCI gel.

Etter endt separering ble totalt utbytte 63,5 mg altså ca 75 %.



Figur 3. Vekt av fraksjoner etter MCI-kolonnekromatografi.

Det ble utført NMR-spektroskopi og analytisk HPLC av samtlige fraksjoner. På bakgrunn av dette ble videre arbeid med fraksjon m3 foreslått.

6.3.9 DPPH-scavenging

Det ble utført DPPH-scavenging av noen utvalgte fraksjoner. Hele fraksjon EtOAc, v1-2,s4,m3 ble benyttet til videre arbeid.

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Scavenget i %	SD	IC50
EtOAc, v1- 2,s4,m2	41,7 µg/ml	23,8	2,9	-
EtOAc, v1- 2,s4,m2	83,3 µg/ml	48,3	1,3	-
EtOAc, v1- 2,s4,m5	41,7 µg/ml	91,9	0,6	14 ± 1 µg/ml
EtOAc, v1- 2,s4,m5	16,7 µg/ml	56,2	3	
EtOAc, v1- 2,s4,m5	8,3 µg/ml	30,8	1,3	

Analytisk HPLC viste at EtOAc, v1-2,s4,m4 inneholdt mange stoffer. Dette ble bekreftet av ¹H-spekter og fraksjonen ble derfor ikke tatt med i de biologiske testene.

6.3.10 XO-hemmende aktivitet

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Hemming i %	SD	IC50
EtOAc, v1-2,s4,m2	41,7 µg/ml	0	14	-
EtOAc, v1-2,s4,m5	41,7 µg/ml	49,7	7,6	-
EtOAc, v1-2,s4,m6	41,7 µg/ml	0,3	13,7	-
Quercetin	2,75 µM	86,5	0,2	1,3 ± 0,2
Quercetin	0,68 µM	20,3	9,8	

Det er interessant å se at fraksjon EtOAc, v1-2,s4,m5 har høy DPPH-scavengingaktivitet men betydelig lavere XO-hemming. Molekylet som står for DPPH-aktiviteten ingen ser ut til å ha liten eller ingen effekt på XO. Siden fraksjonen ikke var helt ren kan også andre stoff i blandingen ha innvirkning på de forskjellige testene.

6.3.11 NMR av EtOAc, v1-2,s4,m5

^1H -spekteret viser at prøven ikke er rein. Den inneholder flere signaler i aromatområdet samt flere signaler fra 2-4 ppm. Koblingskonstanten for de to dublettene ved 5,79 og 7,77 ppm er 9,4. Dette, samt UV-spektrum av fraksjonen som viste absorpsjonsmaksimum ved 345, 296, 257 og 226 nm, indikerte at fraksjonen kunne inneholde kumarinet scopoletin. (Se NMR-spektrum 17 og 44, s. 110 og 123).

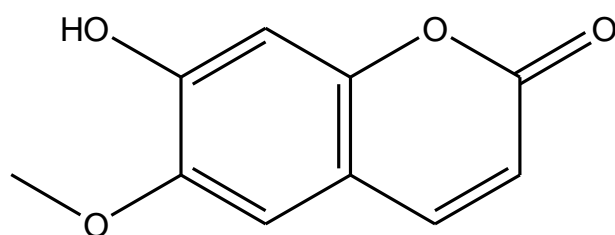
6.3.12 Scopoletin

Det ble tatt ^1H -spekter og analytisk HPLC av kommersiell scopoletin.

UV-absorbansen for scopoletin stemte svært bra med en av toppene som ble observert fra analytisk HPLC av EtOAc, v1-2,s4,m5, men retensjonstiden var ikke identisk (ca 7% i forskjell).

Toppene som ble observert for scopoletin og fraksjonen er gjengitt i tabellen.

EtOAc, 1-2,s4,m5	J (cps)	Scopoletin	J (cps)
3,88 (s)	-	3,91 (s)	-
6,17 (d)	9,4	6,20 (d)	9,4
6,75 (s)	-	6,78 (s)	-
6,94 (s)	-	7,12 (s)	-
7,77 (d)	9,4	7,86 (d)	9,4



scopoletin

Det er stort sett god overenstemmelse mellom scopoletin og fraksjonen, men ved 6,94 og 7,77 ppm er signalene noe mer forskjellige. Dette kan komme av at EtOAc, v1-2,s4,m5 er en urein fraksjon, og at andre stoff i blandingen kan ha innvirkning på kjemisk skift-verdiene. Det er dermed noe usikkert om fraksjonen inneholder scopoletin. NMR-data og UV/HPLC sier at det kan være scopoletin, men

informasjonen er ikke entydig. På grunn av tidsmangel ble det ikke arbeidet videre med fraksjonen.

6.3.13 NMR av EtOAc, v1-2,s4,m3

Spekteret viser at fraksjonen inneholder mange signaler i aromatområdet, men også noen signaler fra 3-4 ppm. Disse signalene, utenom ved 3,89 ppm som kan høre til aromatisk metoksy, kan komme fra karbohydrater. Dubletten ved 5,02 ppm er sannsynligvis fra anomere proton i sukker. Det ser ut som fraksjonen inneholder en blanding av flere stoff. (Se NMR-spektrum 20, s. 111)

6.3.14 Analytisk HPLC av EtOAc, v1-2,s4,m3

Analytisk HPLC viste at fraksjonen inneholdt flere forskjellige stoff. (Se eksperimentelldelen kap. 5.4.7).

6.3.15 Preparativ HPLC av EtOAc, v1-2,s4,m3

På bakgrunn av NMR og analytisk HPLC ble hele fraksjonen applisert på preparativ HPLC. Absorbansen ble satt til 266 nm og de toppene som ble detektert ble samlet separat. Prøven så ganske annerledes ut i forhold til analytisk HPLC. Det ble detektert langt flere topper, både i starten og midten av kjøringen. Mot slutten av kjøringen kom det ut to tette topper som ble navngitt prep 8 og prep 9. Disse fraksjonene ble analysert på HPLC for å bekrefte innholdet. Analytisk HPLC viste at prep 8 og prep 9 hadde tilnærmet identiske retensjonstider og at fraksjonene var svært rene. Det kom en liten topp med fronten. Etter ca 5 minutter kom en enkelt stor topp som sannsynligvis var det ønskede stoffet. Selv om prep 8 og prep 9 så svært like ut ble det tatt NMR av dem for å bekrefte dette.

6.3.16 NMR av EtOAc, v1-2,s4,m3,prep 8-9 og mulig struktur

δ (ppm)	multiplisitet	J (cps)	integral
6.16	<i>d</i>	2.3	1H
5.92	<i>d</i>	2.2	1H
5.02	<i>d</i>	7.4	1H
3.4 – 3.9	flere <i>m</i>	-	ca 7H (unøyaktig)

2.68	<i>s</i>	-	3H
------	----------	---	----

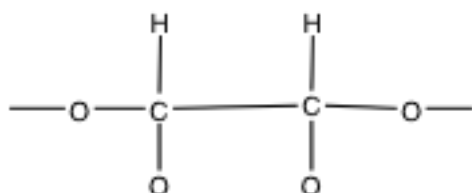
Tabellen viser ^1H NMR spektrum av EtOAc,v1-2,s4,m3,prep8-9. I tillegg ses en bred singlett (0,79 H) ved 4,57 ppm, løsemiddelsignaler fra resthydrogen i CD_3OD , og en liten topp ved 1,29 ppm som antas å være spor av fett. (Se NMR-spektrum 18-19, s. 110-111).

δ (ppm)	Multiplisitet
100,9	<i>d</i>
97,3	<i>d</i>
94,5	<i>d</i>
77,4	<i>d</i>
77,2	<i>d</i>
73,7	<i>d</i>
70,0	<i>d</i>
61,3	<i>t</i>
32,5	<i>q</i>

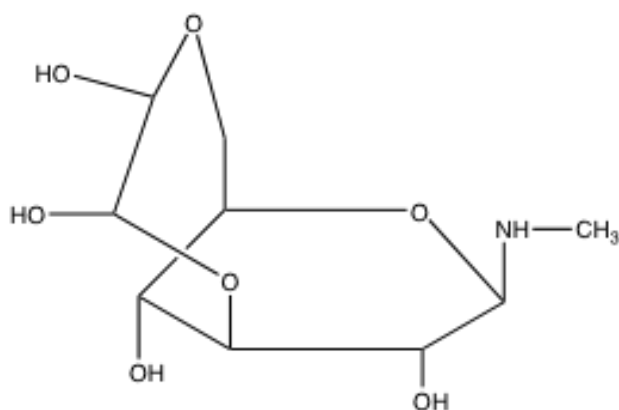
Tabellen viser ^{13}C NMR spektrum av EtOAc,v1-2,s4,MCI3,prep8-9. Antatt multiplisitet fra APT-spektret. I tillegg ses løsemiddelsignal fra CD_3OD .

Ut fra spektrene synes dette å være en relativt ren substans. Signaler i protonspektret ved 3.4 - 3.9 ppm og en 1-protondublett ved 5.02 ppm kan tyde på karbohydrat. Dette støttes av karbonspektret (metylgruppe i posisjon 6 i karbohydrat ved 61.3 ppm, anomerkarbon (C_1) ved 94.5, 97.3 eller 100.9 ppm, og 4 signaler fra $\text{C}_2 - \text{C}_5$ ved 70.0 - 77.4 ppm). Resten av molekylet ser ut til å inneholde tre karbonatomer, ved 32.5 ppm (metylgruppe) og to av metinsignalene ved 94.5, 97.3 og 100.9 ppm. I protonspektret ses metylgruppen som en singlett ved 2.68 ppm. Protonene på de to andre karbonatomene ses ved 5.92 og 6.16 ppm. De kobler med hverandre (J 2.3 cps), men ikke med noen andre protoner. Siden metylgruppen gir en singlett i protonspektret og molekylet ikke inneholder noe kvaternært karbonatom, antas det at metylgruppen sitter på et heteroatom. Ut fra posisjon for metylsignalet i ^1H og ^{13}C

spektrene (2.68 og 32.5 ppm) antas det at den ikke sitter på O, men N og S (som SO) kan nok være mulige. De to koblede protonene ved 5.92 og 6.16 ppm ligger i området for olefiniske protoner, men en koblingskonstant på 2.3 cps stemmer dårlig med olefiniske koblinger. Posisjon i karbonspektet ved 90 – 100 ppm er heller ikke typisk for olefinkarboner, selv om uvanlig skjermede karboner kanskje kan finnes der. Imidlertid kan skiftposisjonene stemme med strukturelementet:



De tre delene av molekylet (karbohydratdelen, C₂-delen vist over og N- eller SO-bundet metylgruppe) er vanskelige å passe inn i en struktur med C₂-delen mellom karbohydrat og metyl. En struktur som denne:



ser ut til å stemme med samtlige NMR-data, men er slett ikke den eneste mulige strukturen. Det kan nevnes at dersom H på nitrogen skiftes ut langsomt med deuteroner fra løsemidlet, kan en topp fra dette protonet også tenkes å være synlig i spektret. H på N gir ofte brede signaler. Et bredt signal som teller ut for 0.79 ppm foreligger i spektret ved 4.57 ppm.

Ut fra et SciFinder-søk er den viste strukturen ikke rapportert tidligere, og et "similarity search" gir heller ikke noen kjente nærstående strukturer. NMR-data for N-metyl-glukosamin er imidlertid funnet (Avalos et al 1998), og det er god overensstemmelse mellom de observerte skiftverdiene for N-metylgruppen og

litteraturens. Beregnede spektraldata fra SciFinder stemmer også godt med de observerte.

6.3.17 Videre separering av EtOAc-kolonneforurensing

Siden fraksjonen som inneholdt forurensing fra Versaflashkolonnen veide over 20% av EtOAc-E ble videre arbeid med dette stoffet utført. For å finne ut hva forurensingen kunne være ble EtOAc, v1-2, s1 separert ytterligere en gang til med Sephadex LH20, omvendtfase Versaflash og til slutt RP18. Deretter ble ca 100 mg av fraksjonen forsøkt acetyllert med eddiksyreanhydrid i pyridin, som fungerte som både løsemiddel og katalysator. ^1H -, ^{13}C -NMR og analytisk HPLC ble benyttet i et forsøk på å identifisere stoffene, men det ble ikke vellykket, ingen acetylering syntes å ha funnet sted. Andre fraksjoner ble dermed prioritert overfor kolonneforurensingen.

6.4 Arbeid med BuOH-fraksjonene

Ca 9 g av BuOH-E ble applisert på en omvendtfase Versaflashkolonne og kromatografert (eksperimentelldel, kap. 5.5.1). Utbytte fra de forskjellige fraksjonene vises i tabellen.

Fraksjon	Vekt i gram	Utbytte i % av påsatt mengde
BuOH, v1	0,25	2,8
BuOH, v2	2,72	30,2
BuOH, v3	1,26	14,0
BuOH, v4	0,13	1,4
BuOH, v5	0,29	3,2
BuOH, v6	0,42	4,7
BuOH, v7	0,05	0,6
BuOH, v7	0,10	1,1
BuOH, v9	0,13	1,4
BuOH, v10	0,06	0,7
Totalt	5,41	60,4

Grunnen til at utbytte ble såpass lavt kan være at en del av stoffene satt seg fast i kolonnen, eller at det ikke ble benyttet en kraftig nok eluent. I tillegg kan BuOH-E ha inneholdt en del vann som etter fraksjoneringen ble dampet bort. For videre arbeid ble de fraksjonene som så ut til å inneholde interessante (NMR) og like stoffer (analytisk TLC) slått sammen og prioritert for videre arbeid. Dermed ble fraksjon v2 og v3 slått sammen.

6.4.1 DPPH-scavenging

Det ble utført DPPH-scavengingstest på to av Versaflashfraksjonene.

Ekstrakt	Kons. i kyvette i µg/ml	Scavenget i %	SD
BuOH, v5	167	18,3	2,9
BuOH, v6	167	15,7	1,1

Disse to fraksjonene, foruten v2-3, var de fraksjonene som så mest interessante ut, men fraksjonene har lav aktivitet. IC₅₀-verdien er sannsynligvis mye høyere enn 167 µg/ml. Alt av fraksjon v2 og v3 ble brukt til videre separasjon.

6.4.2 Videre arbeid med BuOH-fraksjonene

BuOH, v2-3 (ca 4 g) ble applisert på en Sephadex LH20 kolonne og kromatografert (eksperimentelldel, kap 5.5.2). BuOH,v2-3,s4 (ca 1,7 g) så ut til å inneholde interessante stoff og ble prioritert for videre arbeid. Deretter ble BuOH, v2-3,s4 applisert på samme Sephadex LH20-kolonnen og kromatografert (eksperimentelldel, kap 5.5.3). Fraksjon BuOH, v2-3,s4,s2 så interessant ut og ble applisert på en omvendtfase Versaflashkolonne og kromatografert (eksperimentelldel, kap 5.5.4). BuOH, v2-3,s4,s2,v1 (40,9 mg) og BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4 (ca 120 mg). Sistnevnte ble applisert på en MCI-kolonne for videre opprensing.

6.4.3 DPPH-scavenging

Noen utvalgte fraksjoner ble testet for radikalfangende effekt.

Ekstrakt	Kons. i kyvette i µg/ml	Scavenget i %	SD
BuOH, v2-3,s2	167	6,6	0,4
BuOH, v2-3,s3	167	3,6	0,1
BuOH, v2-3,s4,s2	167	6,2	0,3
BuOH, v2-3,s4,s4	167	17,7	0,8

Samtlige av fraksjonene har svært lav effekt.

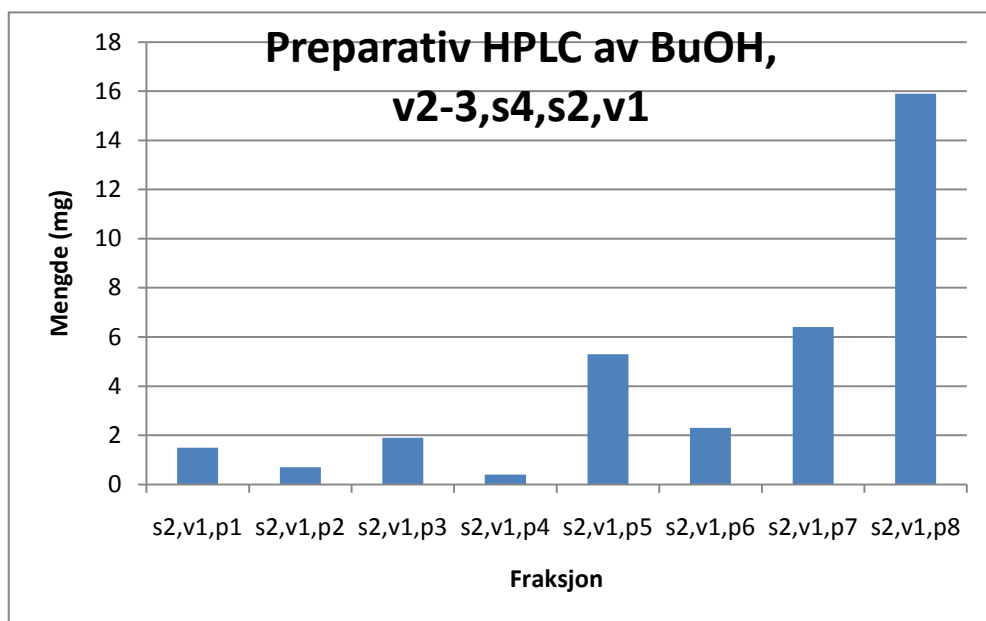
6.4.4 NMR av BuOH, v2-3,s4,s2,v1

¹H-spekteret viser flere topper i aromatområdet, ca 6-8 ppm, flere topper i karbohydratområdet, og noen topper som kan høre til alifatiske protoner rundt 1,38 ppm. Toppene i karbohydratområdet kan komme fra glykosider som kan være bundet til for eksempel en aromatgruppe. Fraksjonen inneholdt sannsynligvis en blanding av flere stoffer og det blir dermed vanskelig å si noe nøyaktig om strukturelementer.

¹³C-spekteret viser at stoffet har karbonylgruppe ved 180,3 ppm, trolig enten i form av karboksylsyre eller ester. Signalene fra 116-142 ppm hører sannsynligvis til aromatiske molekyldele. Ved 21,7 ppm er det et stort signal som kan komme fra alifatiske karbonatomer. Signalene mellom 60-80 ppm kan komme fra C-O fra karbohydrater. (Se NMR-spektrum 15-16, s. 109).

6.4.5 Preparativ HPLC

Hele fraksjonen, BuOH, v2-3,s4,s2,v1, ble applisert på preparativ HPLC med metode 6, s. 91. Bølgelengden for absorbans ble satt til 210 nm. Det ble detektert flere topper og de ble samlet separat. Deretter ble fraksjonene samlet og dampet til tørrhet.



Figur 4. Vekt av fraksjonen etter preparativ HPLC.

34,4 mg av totalt 40,9 mg ble eluert ut av kolonnen. Utbytte blir dermed 84%. Noe av fraksjonen kan dermed ha satt seg fast i kolonnen. I tillegg kan unøyaktige vekter forklare en del av differansen.

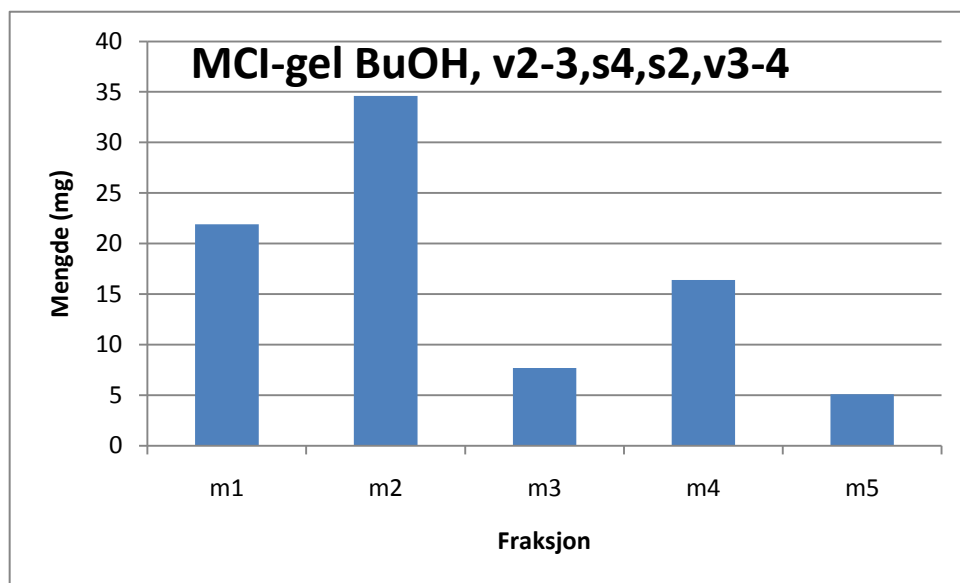
6.4.6 NMR

Selv om deuterert metanol ble grundig blandet med de inndampede fraksjonene så det ut som at ingen av fraksjonene lot seg løse. Fraksjonen som ble applisert på kolonnen var lett løselig i metanol. Etter inndamping la det seg en hinne på innsiden av rundkolbene. Denne hinnen lot seg ikke løse med deuterert metanol. NMR viste at samtlige prøver syntes å være helt tomme. En av forklaringene på dette kan være at fraksjonen før HPLC inneholdt en blanding av forskjellige stoffer, både stabile og ustabile. Denne fraksjonen kan ha inneholdt stoffer som stabiliserte de ustabile stoffene. Da prøven ble opprenset ved HPLC, forsvant en del av de stabiliserende stoffene, og de ustabile stoffene kan da ha blitt brutt ned til uløselige komponenter.

6.4.7 MCI-gel kromatografi av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4

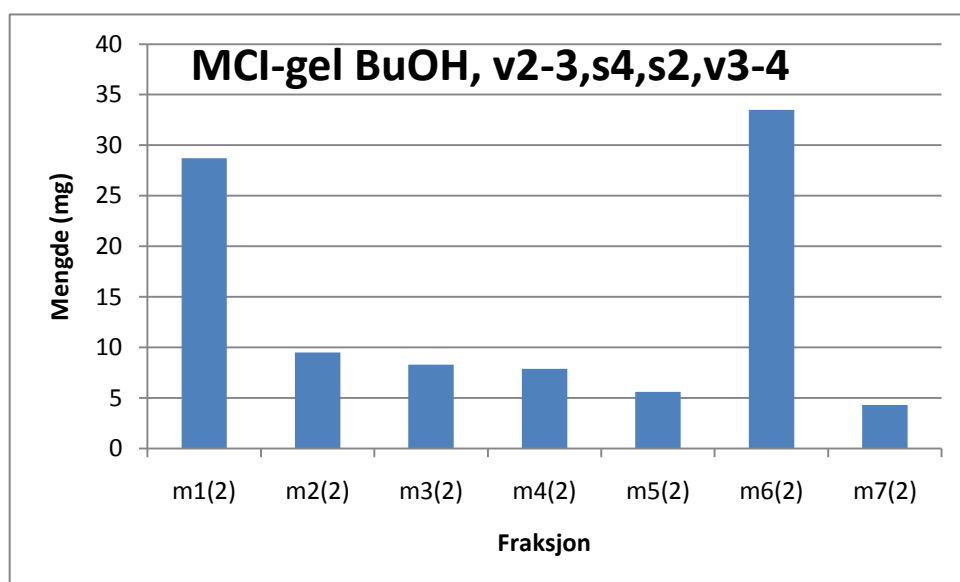
Dette var første gang en kolonne pakket med MCI-gel ble benyttet. Siden preparativ HPLC av en lignende fraksjon hadde mislykkes ble det bestemt at det først skulle halvparten av fraksjonen appliseres på kolonnen, og hvis stoffet så stabilt ut etter

kromatograferingen skulle prosedyren gjentas for resten av fraksjonen. Dermed ble første halvdel samlet i 5 fraksjoner og andre halvdel samlet i 7 fraksjoner.



Figur 5. Vekt av fraksjonen etter MCI-gel kromatografi, første del.

Selv om samme eluenter ble benyttet for begge fraksjonene ble andre halvdel samlet i 7 fraksjoner. Sammenslåingen av fraksjonene ble gjort på bakgrunn av analytisk TLC.



Figur 6. Vekt av fraksjonen etter MCI-gel kromatografi, annen del.

Etter sammenslåingen ble BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m1-2 og BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m1-4(2) analysert med HPLC for å se om noen av fraksjonene egnet seg for

preparativ HPLC. BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m1-2 inneholdt 3-4 hovedtopper og noen av dem kom svært tett innpå hverandre. BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m1(2) inneholdt mye av det samme. BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2) så svært lovende ut. Ut ifra analytisk HPLC ved 280 nm så det ut som fraksjonen kun inneholdt ett hovedstoff, men ved 200 nm ble 3 andre mindre topper også detektert. Hovedtoppen hadde bølgelengdemaksimum ved 208 og 267 nm.

6.4.8 DPPH-scavenging

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Scavenget i %	SD	IC50
BuOH, v2-3,s3,s2,v3-4,m4	66,7 µg/ml	12	1,1	-

Siden alt av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3 ble benyttet til videre arbeid, ble det utført biologiske tester på nabofraksjonen, som inneholdt noe av det samme som m3.

BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m4 er tilnærmet inaktiv som radikalfanger.

6.4.9 XO-hemmende aktivitet

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Hemming i %	SD	IC50
BuOH, v2-3,v3-4,m4	66,7 µg/ml	11	10,7	-
Quercetin	2,75 µM	86,5	0,2	1,3 ± 0,2
Quercetin	0,68 µM	20,3	9,8	

Fraksjonen er også lite aktiv som XO-hemmer.

6.4.10 NMR BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2)

Denne fraksjonen inneholder en triplett ved 6,28 ppm, en multipllett ved 7,33 og en dublett ved 7,81. I tillegg er det flere mindre signaler som sannsynligvis kommer fra et annet molekyl i fraksjonen. Dette gjelder dubletten ved 5,97 ppm, og multipllettene ved 6,78 og 7,07. I tillegg har fraksjonen en stor singlet ved 1,88, og flere signaler rundt 2,22, 2,7 og 3,6-4,5 ppm. (Se NMR-spektrum 21, s. 111).

6.4.11 Preparativ HPLC av v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2)

Hele fraksjonen ble applisert på preparativ HPLC. Det var dessverre kommet luft inn i systemet slik at det var vanskelig å detektere noen topper. Derfor ble prøvene samlet separat for hvert minutt av kjøringen. Etterpå ble alle fraksjonene analysert med HPLC for å bedømme prøvenes renhet. Alle fraksjonene utenom prep 3 inneholdt mer enn 2 topper av betydning. Prep 3 viste kun ett signal ved alle målte bølgelengder.

6.4.12 NMR og MS av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3

Etter opprensing med HPLC viser ^1H - og ^{13}C -spekteret (se NMR-spektrum 45-46, s. 124) at prøven ble gjort renere. Multipletten ved 7,33 ppm og signalene med lavere intensitet i aromatområdet er borte. Signalene rundt 4,5 er også borte. ^{13}C -spekteret viser totalt 10 karbonatomer i molekylet. Det ble også tatt DEPT-135-, COSY- og HMQC-spekter av fraksjonen. (Se NMR-spektrum 40-42, s. 121-122)

^{13}C - og DEPT-135-spekter av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3			
Kjemisk skift δ , basert på ^{13}C -spekter	Kjemisk gruppe	Kjemisk skift δ , basert på DEPT-135-spekter	Kjemisk gruppe
11,6	CH_3	12,5	CH_3
39,9	CH_2	40,8	CH_2
61,7	CH-O	62,6	CH_2
71,1	CH-O	72,0	CH
85,3	CH-O	86,2	CH
87,6	CH-O	88,5	CH
111,0	Aromatisk/olefinisk C	-	Kvaternært karbon
137,3	Aromatisk/olefinisk C	138,2	CH
151,5	Aromatisk/olefinisk C	-	Kvaternært karbon
165,7	C=O	-	Kvaternært karbon

Forskjellene i kjemisk skift-verdi mellom ^{13}C - og DEPT-135-spekteret kommer av at TMS-toppen ikke var detekterbar i ^{13}C -spekteret og spekteret ble dermed ikke korrekt kalibrert.

^{13}C -spekter av mulig molekyl, litteraturdata ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	
Kjemisk skift δ , basert på ^{13}C -spekter	Kjemisk gruppe
12,0	CH_3
41,5	CH_2
62,5	CH_2
71,6	CH
85,6	CH
88,9	CH
110,6	C
136,1	CH
152,0	C
165,1	C

(Reddy og Dhananjaya 2000)

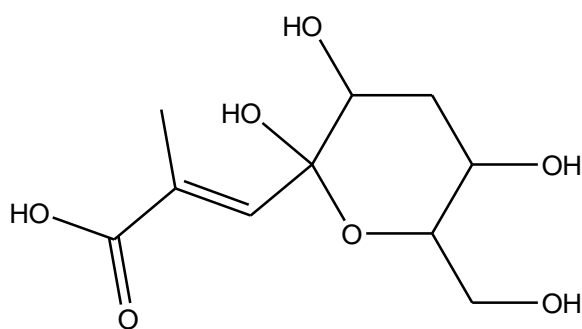
Kjemisk skift δ , fraksjon (CD_3CD)	Kjemisk skift δ , litteratur ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)
1,90 (s)	1,87 (s)
2,28 (m)	2,65 (m)
3,77 (dt)	4,18 (dt)
3,95 (dd)	4,46 (br s)
4,43 (dt)	5,02 (br s)
6,27 (t)	6,97 (t)
7,78 (s)	8,11 (s)
-	13,06 (br s)

(Reddy og Dhananjaya 2000)

Karbondata fra litteraturen stemmer godt overens med karbondata fra BuOH-fraksjonen, men dataene er noe sprikende ved sammenligning av ^1H -spektra.

^1H -spektra blir vanligvis mer påvirket av forskjellige løsningsmidler enn karbonspektra. Dette kan forklare at det er mer variasjon mellom ^1H -spekter fra litteratur sammenlignet med BuOH-fraksjonen, enn for ^{13}C -spekteret.

Ved å analysere disse resultatene, samt HMQC- og COSY-spektra ble det klart at BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3 kunne inneholde følgende molekyl:



2-propenic acid, 2-methyl-3-[tetrahydro-2,3,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)-2H-pyran-2-yl]

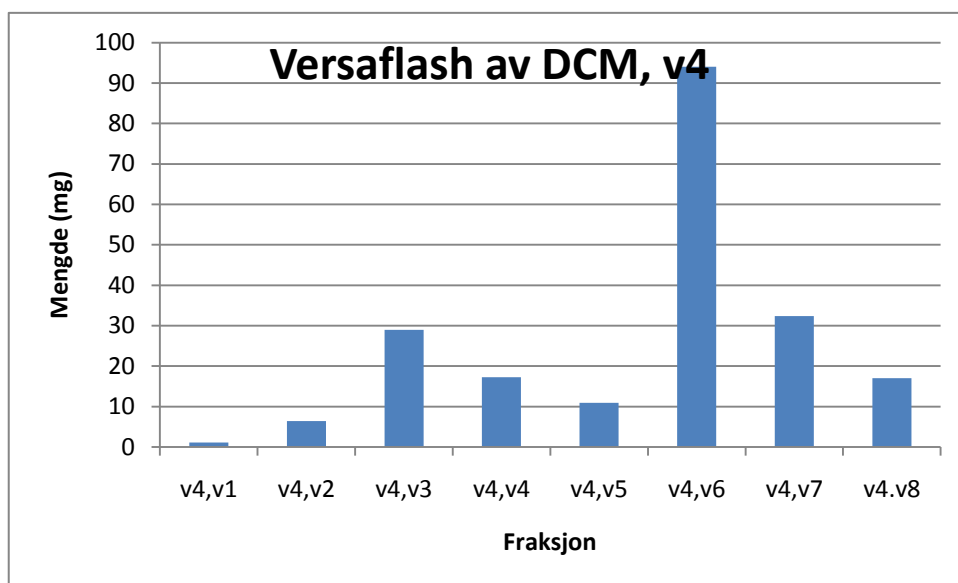
Dette molekylet er kun rapportert én gang tidligere fra litteraturen, men da fra en marin svamp, *Mycale mytilorum* (Reddy og Dhananjaya 2000). Dette betyr at det er første gang at 2-propensyre, 2-metyl-3-[tetrahydro-2,3,5-trihydroxy-6-(hydroxymetyl)-2H-pyran-2-yl] blir identifisert i en plante. Stereokjemien til molekylet ble ikke undersøkt. Det ble heller ikke utført noen biologiske tester av fraksjonen siden det viste seg at stoffet ble brutt ned ved lagring i kjøleskap (analytisk HPLC).

Det ble utført MS av fraksjonen. Et molekyllion ble observert ved 243. Dersom molekylet ovenfor deprotoneres blir vekten 243 ($248-5 = 243$). Det er derfor sannsynlig at dette er den korrekte strukturen for stoffet i fraksjonen.

6.5 Arbeid med DCM-fraksjonene

Etter at hele DCM-fraksjonen ble applisert på en normalfase Versaflashkolonne, ble DCM, v3–v6 kromatografert på en omvendtfase Versaflashkolonne (eksperimentelldel, kap. 5.6.9). DCM, v3,v1-7 så ikke ut til å inneholde stoff av interesse og ble ikke prioritert for videre arbeid. Ut ifra NMR og analytisk HPLC

hadde fraksjonene fra DCM, v4, v3-v8, DCM, v5, v1-v4 og DCM, v6, v1-v4 interessant innhold. Videre arbeid med disse fraksjonene ble dermed prioritert.

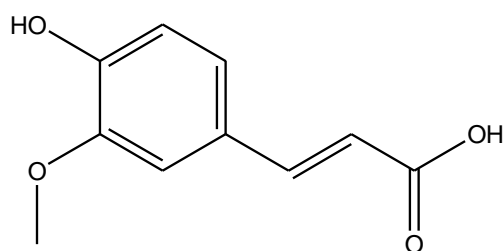


Figur 7. Vekt av fraksjoner etter Versaflash kolonnekromatografi av DCM, v4

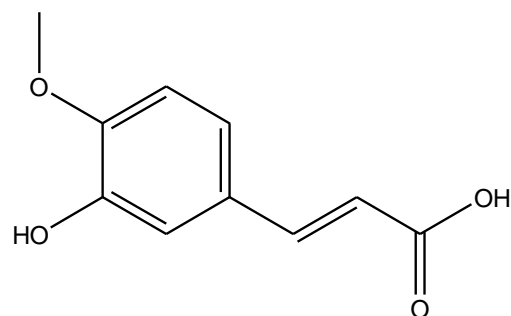
6.5.1 DCM, v4,v3

Fraksjonen DCM, v4,v3 veide 29 mg. Fraksjonen ble analysert med HPLC. Ved 210 nm, der svært mange substanser har absorpsjon, ble det observert flere topper, men ved 280 nm så prøven ganske ren ut

Som ^1H -spekteret viser (se NMR-spektrum 24, s. 113) inneholdt denne fraksjonen sannsynligvis et aromatisk stoff. Spekteret tydet på en forbindelse med en bensenring, en aromatisk metoksygruppe og en olefinisk dobbeltbinding. I et forsøk på å rense prøven, ble fraksjonen applisert på preparativ HPLC uten særlig hell. Spekteret fra DCM, v4,v3 ble analysert på nytt og det så ut til å være ferulasyre. Ren ferulasyre og isoferulasyre ble derfor analysert med HPLC, for å se etter likheter mellom de rene substansene og det ukjente stoffet. Både ferulasyre og isoferulasyre gav lik retensjonstid som DCM, v4,v3. Etterpå ble det tatt ^1H -spektra av ferulasyre og isoferulasyre. Fraksjon DCM, v4,v3 gav topper tilsvarende ferulasyre, og ikke isoferulasyre. (se NMR-spektrum 25, s. 114).



Ferulasyre



Isoferulasyre

6.5.2 Biologiske tester av ferulasyre

På grunn av lite stoff i fraksjonen som inneholdt ferulasyre ble DPPH-scavenging og XO-aktiviteten bestemt for kommersiell ferulasyre.

6.5.3 XO-test på ferulasyre

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Hemming i %	SD	IC ₅₀
Ferulasyre	167 µM	44,5	22,4	-
Ferulasyre	83,3 µM	26,7	8,8	
Quercetin	2,75 µM	86,5	0,2	1,3 ± 0,2
Quercetin	0,68 µM	20,3	9,8	

I litteraturen er det rapportert svært sprikende IC₅₀-verdier for ferulasyres XO-hemming. Özyürek et al 2009 fant en IC₅₀-verdi på 1,86 µM, mens Itagaki et al 2008 fant en IC₅₀-verdi på 6614 µM. IC₅₀-verdi på 94 µM er også rapportert (Chang et al 2007). Disse store variasjonene kan komme av at det er benyttet forskjellige prosedyrer. Itagaki et al brukte XO-indusert lysemisjon, mens de andre har målt endring i urinsyrekonsentrasjonen. Ferulasyren som ble benyttet ved Farmasøytisk institutt gav altså en IC₅₀ verdi som ligger imellom disse tidligere rapporterte verdiene. Det er rimelig å anta at den benyttede ferulasyrens IC₅₀ verdi ligger rundt 200 µM.

6.5.4 DPPH-test på ferulasyre

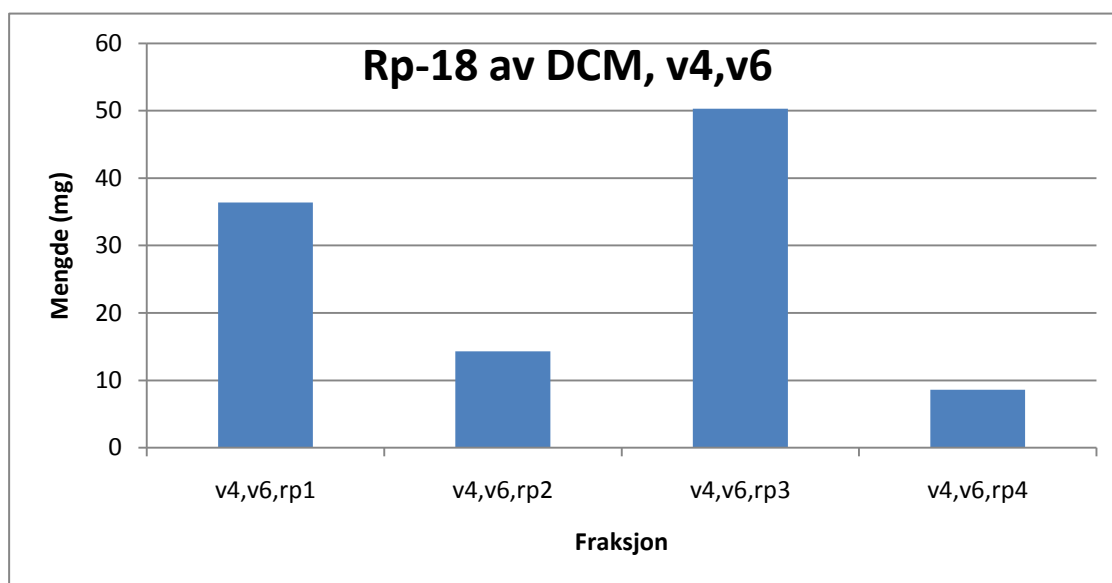
Ekstrakt	Kons. i kyvette	Scavenget i %	SD	IC50
Ferulasyre	167 μ M	75,9	2,4	66 \pm 4 μ M
Ferulasyre	83,3 μ M	56,7	2,2	
Ferulasyre	41,7 μ M	36,2	1	

DPPH-scavengingaktiviteten stemmer relativt godt overens med tidligere funn som gav IC₅₀-verdi på 86 μ M (Malterud og Rydland 2000). Samme prosedyre ble benyttet i begge forsøkene. Disse to resultatene har derfor et godt sammenligningsgrunnlag.

6.5.5 DCM, v4,v6

Fraksjonen DCM, v4,v6 veide 94 mg. ¹H-spekteret av fraksjonen viste mange topper mellom 4,2-4,8 ppm. Ved ca 1,3 ppm er det et signal som sannsynligvis hører til metyl, eller metylengrupper. Signalene mellom 4,2-4,8 ppm lignet ikke ¹H-signalene for karbohydrater, som var observert tidligere. Siden fraksjonen luktet svovelaktig ble den prioritert for videre arbeid.

DCM, v4,v6 ble applisert på en RP18-kolonne og eluert som beskrevet i eksperimentelldelen kap. 5.6.5.



Figur 8. Vekt etter RP18 kolonnekromatografi av DCM, v4,v6.

Renheten av fraksjon DCM, v4,v6,rp1 (36,4 mg) så ut til å være høy både ved analytisk HPLC og NMR. Derfor ble det tatt COSY- HMQC og DEPT135-spekter av denne fraksjonen (se NMR-spektrum 26-30, s. 114-116). I ^1H -spekteret er det flere mindre topper mellom 1,2-2,2 som sannsynligvis ikke hører til hovedsignalene. Fraksjon v2 (14,3 mg) var svært lik v1, mens v3 og v4 inneholdt uinteressante stoffer. I håp om å opprense DCM, v4,v6,rp1 ble den på ny kromatografert med RP18 kolonnen.

6.5.6 DPPH-scavenging

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Scavenget i %	SD	IC50
DCM, v4,v6,rp2	83,3µg/ml	5,4	0,2	-

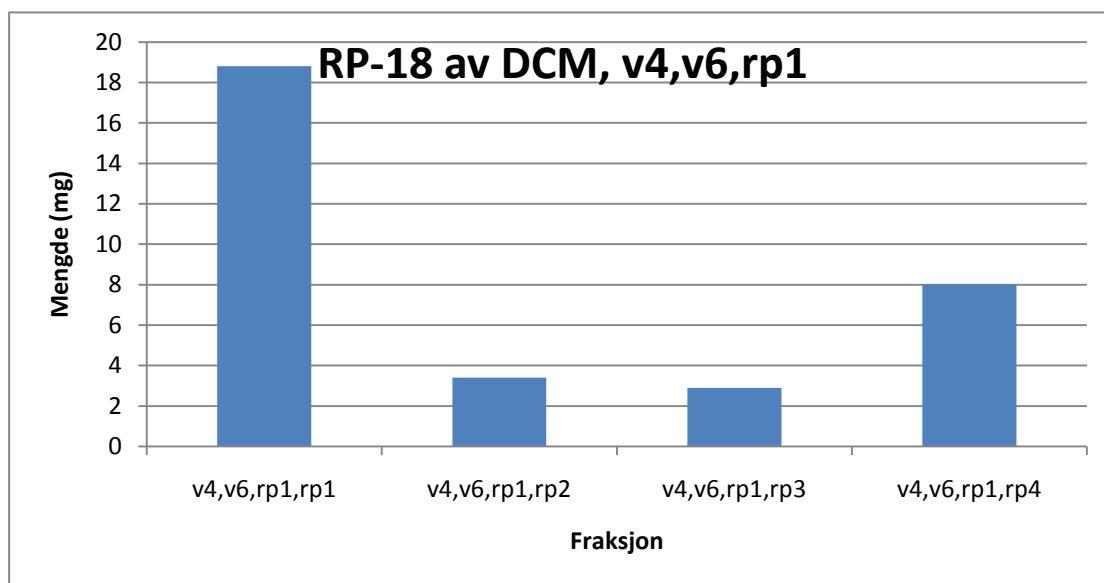
6.5.7 XO-hemmende effekt

Fraksjon	Kons. I kyvette	Hemmet i %	SD	IC50
DCM, v4,v6,rp2	83,3	-4,8	11	-
Quercetin	2,75 µM	86,5	0,2	1,3 ± 0,2
Quercetin	0,68 µM	20,3	9,8	

Begge de biologiske testene viser at fraksjonen er inaktiv som DPPH-scavenger og XO-hemmer.

6.5.8 RP18 kolonnekromatografi av DCM, v4,v6,rp1

Hele fraksjon DCM, v4,v6,rp1 ble på ny applisert og eluert ut av samme reverse phase-kolonne. Ved å bruke svakere starteluent håpet vi å få bedre separasjon enn sist.



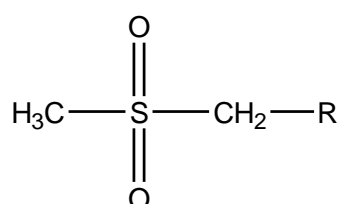
Figur 9. Vekt av fraksjoner etter RP18 kromatografi av DCM, v4,v6,rp1.

6.5.9 NMR av DCM, v4,v6,rp1,rp1

NMR av fraksjonene viste at DCM, v4,v6,rp1,rp1 var den mest interessante fraksjonen, men den forble relativt lik originalfraksjonen DCM, v4,v6,rp1. Samtidig er en del av de svake signalene borte, så fraksjonen ble noe renere. De andre 3 fraksjonene så ikke rene ut og ble ikke prioritert videre. ^1H -spekteret av DCM, v4,v6,rp1,rp1 viser at det er mange signaler mellom 4,2 og 4,6 ppm, noe som stemmer med tidligere rapporterte svovelholde stoff (Burton og Kaye 1991). Disse signalene tilsvarer enten en metylengruppe bundet til SO_2 - eller en metylengruppe i mellom to svovelatomer $\text{S}-\text{CH}_2-\text{S}$. I tillegg ble det observert singletter ved 2,66- 2,68- 3,08- og 3,10 ppm. (Se NMR-spektrum 31 og 32, s. 117).

En metylgruppe som sitter i enden av et molekyl og er bundet til en SO_2 -gruppe vil ha kjemisk skiftverdi rundt 3,05 ppm (Burton og Kaye 1991). Et sannsynlig strukturelement i DCM, v4,v6,rp1,rp1 er en terminal metylgruppe bundet til SO_2 . En CH_3-S -gruppe i enden av molekylet ville gitt en ppm-verdi rundt 2,25. Denne delstrukturen er usannsynlig siden den nærmeste singlett har ppm-verdi 2,66.

DCM, v4,v6,rp1,rp1 kan dermed inneholde følgende delstruktur:



På grunn av komplekst mønster i NMR-spekteret er det sannsynlig at fraksjonen inneholder en blanding av flere beslektede substanser.

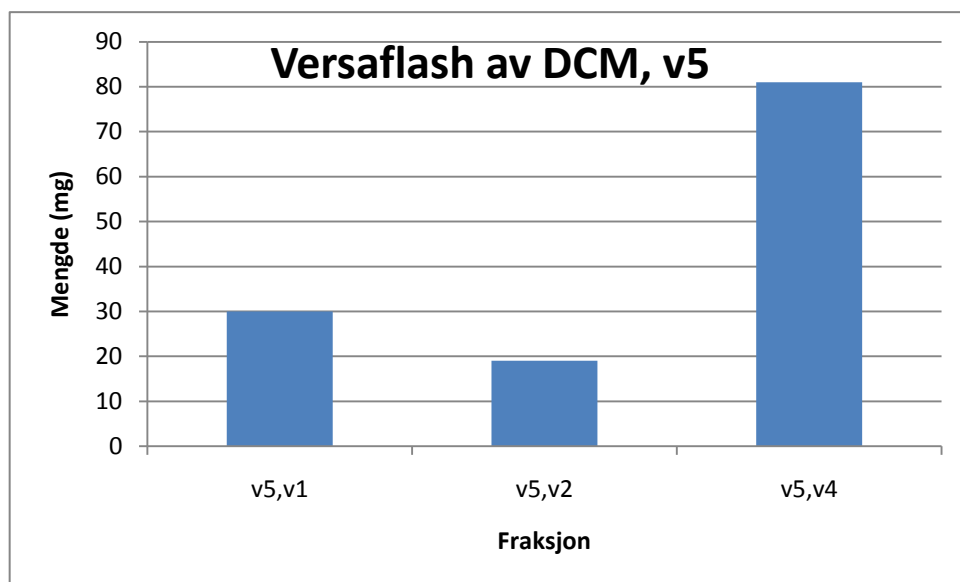
6.5.10 DPPH-scavenging

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Scavenget i %	SD	IC50
DCM, v4,v6,rp1,rp2	83,3 µg/ml	3,3	1,3	-

Testen viser at fraksjonen, som er ganske lik v4,v6,rp1,rp1 er inaktiv som DPPH-scavenger. På grunn av enzymmangel ble det ikke utført XO-test for denne fraksjonen.

6.5.11 DCM, v5,v1-4

DCM, v5 ble applisert på en omvendtfase Versaflashkolonne og kromatografert (eksperimentell del kap 5.6.7) I inndampingsfasen eksploderte en rotavapor og fraksjon v3 og v5 ble ødelagt.



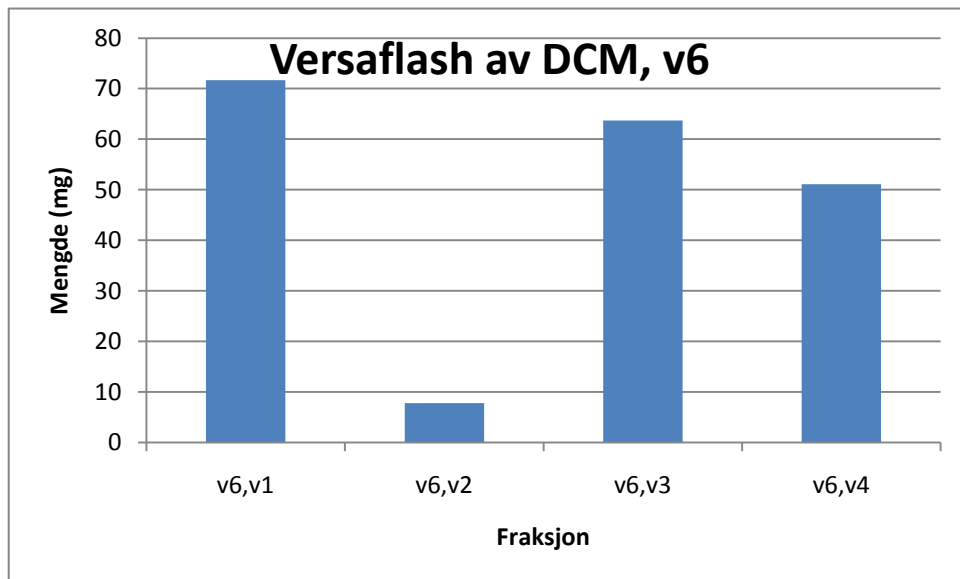
Figur 10. Vekt av fraksjoner etter Versaflashkromatografi av DCM, v5

Det ble tatt ^1H -spekter av alle 3 fraksjonene. Ingen av fraksjonene så ut til å inneholde spesielt interessante stoff. (Se NMR-spektrum 33, s. 118).

Etterpå ble DCM, v5,v1 analysert med HPLC. Fraksjonen så svært ren ut. Det ble kun observert 1 topp av betydning, som kom ut like etter fronten. Denne toppen hadde maks absorbans ved 265 nm. Deretter ble hele fraksjonen applisert på preparativ HPLC. Metode 5 ble benyttet. Bølgelengde 265 nm ble brukt til deteksjon og de toppene som ble detektert ble samlet separat. Kromatogrammet av fraksjonen så ganske likt ut som for analytisk HPLC, men separasjonen var noe bedre. Etter endt preparativ HPLC ble fraksjonene analysert med HPLC for å bekrefte innholdet. Denne gangen så kromatogrammet helt annerledes ut. Fraksjonene inneholdt 6-10 forskjellige topper, og ingen av dem lignet toppen fra fraksjonen før preparativ HPLC. Stoffet som ble applisert var blitt omgjort til mange andre stoff, og separasjonen var mislykket. Årsaken til dette kan være at stabiliserende stoffer i fraksjonen ble separert fra ustabile stoffer som da ble brutt ned.

6.5.12 DCM, v6,v1-4

Etter Versaflashkromatograferingen ble det tatt ^1H - og ^{13}C -spektra av alle fraksjonene og alle fraksjonene ble analysert med HPLC.



Figur 11. Vekt av DCM, v6,v1-v4 etter endt Versaflashkolonnekromatografi.

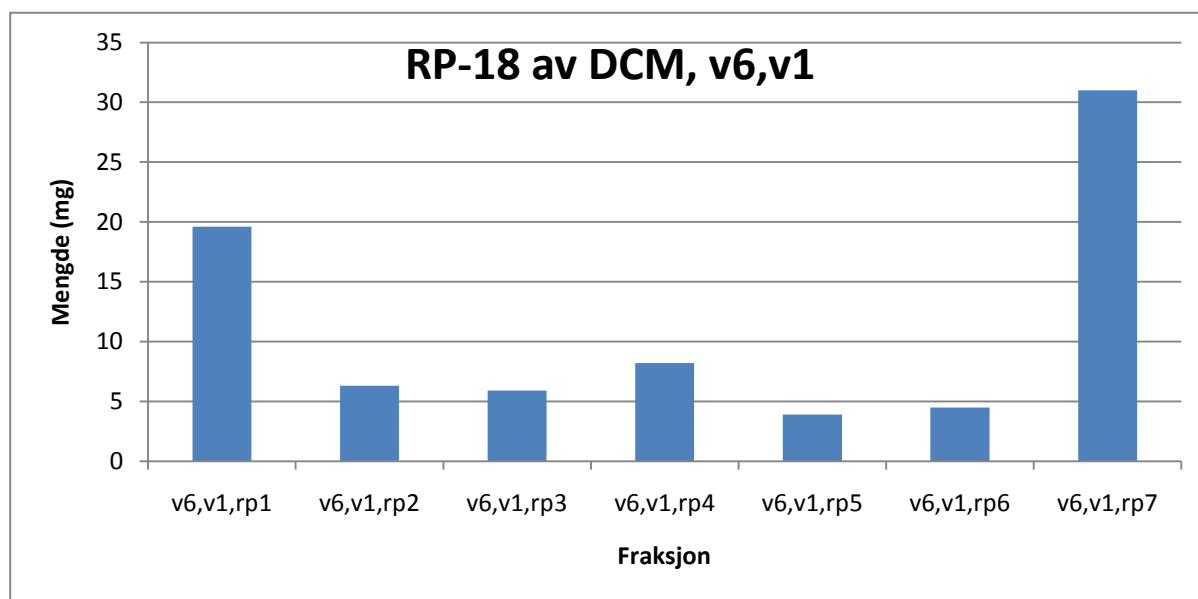
6.5.13 NMR av DCM, v6,v1

^1H -spekteret av DCM, v6,v1 viste at fraksjonen inneholdt signaler fra aromat/olefinområdet, O- eller N-substituerte karbon, samt metyl- eller metylengrupper.

^{13}C -spekteret viser at det er mange karbonatomer i fraksjonen. Selv om en ikke kan si noe entydig om mengdeforhold i et ^{13}C -spekter, er det tydelig at fraksjonen inneholdt en hovedsubstans. Dette molekylet inneholdt sannsynligvis en karboksylgruppe, enten fra en ester eller syre (179 ppm), O-substituerte karbonatomer (72-74 ppm) og en metylgruppe (21 ppm). (Se NMR-spektrum 34 og 35, s 118-119). For å bekrefte innholdet i fraksjonen ble videre separasjon prioritert. På grunn av tidsmangel ble det ikke gjort noe mer med de andre 3 fraksjonene.

6.5.14 RP18 av DCM, v6,v1

Hele fraksjonen (71,8 mg) ble applisert og kromatografert på en RP18-kolonne. Det ble benyttet svært svak starteluent for å separere de mest polare stoffene fra de mindre polare. Etter endt kromatografi ble samtlige fraksjoner analysert med HPLC.



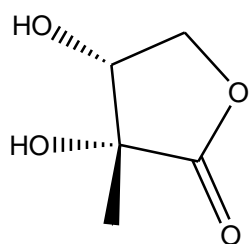
Figur 12. Vekt av fraksjoner etter RP18 kolonnekromatografi av DCM, v6,v1.

Total vekt etter kromatografi var 79,4 mg. Forskjellen i vekt kan komme av at fraksjonene inneholdt noe vann, eller usikkerhet ved veiing.

6.5.15 NMR av DCM, v6,v1,rp1-7

Det ble tatt ^1H -spektra av samtlige fraksjoner og ^{13}C -spektra av fraksjon rp1, rp4 og rp7. ^1H -spekteret av DCM, v6,v1,rp1 viser at separasjonen var vellykket. Nesten alle småsignalene i aromat/olefinområdet samt de aller fleste signalene fra 1,4-4,0 ppm er

borte. Endringen i renhet gjenspeiles også i ^{13}C -spekteret. Foruten en liten topp rundt 100 er alle toppene med lav intensitet borte. Det er kun 4 topper igjen i spekteret og det er de 4 som var tydeligst fra ^{13}C av DCM, v6,v1. (Se NMR-spektrum 36-37, s. 119-120). Videre analyse av NMR-spektra viste at stoffet var 2-C-metyl-erytronolakton. Dette stoffet, med 2*R*,3*R*,-stereokjemi er tidligere rapportert i seks planter, men vårt funn er det første i familien Alliacea. Den spesifikke stereoisomeren (2*R*,3*R*) ble først rapportert av de Pascual Theresa et al (1980). En isomer uten spesifikk stereokjemi ble omtrent samtidig rapportert ved Farmasøytisk institutt, avdeling for farmakognosi (Kringstad et al 1980).



2*R*,3*R*-2-methyl-erytronolactone

6.5.16 Optisk rotasjon

Laktonet ble målt for optisk rotasjon. Gjennomsnittet av målingene gav spesifikk rotasjon $[\alpha]_{\text{D}} = -20^\circ$. Etter søk i tilgjengelig litteratur ble det klart at laktonet hadde 2*R*,3*R*-absoluttkonfigurasjon, noe som stemmer med tidligere funn fra naturen (Nakayama et al 2003, Ono et al 2000).

6.5.17 2*R*,3*R*-2-C-metyl-erytronolakton

2*R*,3*R*-2-C-metyl-erytronolakton er som sagt tidligere identifisert, men det finnes begrenset mengde litteratur om molekylet. I naturen kan laktonet ha stimulerende effekt på enkelte insekters egglegging, såkalt oviposition stimulant (Nakayama et al 2003). Laktonets biologiske aktivitet er lite undersøkt. DPPH- og XO-tester er tidligere ikke utført.

6.5.18 DPPH-scavenging

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Scavenget i %	SD	IC50
Laktonet	167 μ M	1,8	0,9	-

2*R*,3*R*-2-C-metyl-erytronolakton er tydelig inaktivt og har dermed ingen radikalfangende egenskaper.

6.5.19 XO-hemming

Ekstrakt	Kons. i kyvette	Hemming i %	SD	IC50
Laktonet	166,7 μ M	-4	13,6	-
Quercetin	2,75 μ M	86,5	0,2	1,3 \pm 0,2 μ M
Quercetin	0,68 μ M	20,3	9,8	

2*R*,3*R*-2-C-metyl-erytronolakton er også inaktivt som XO-hemmer.

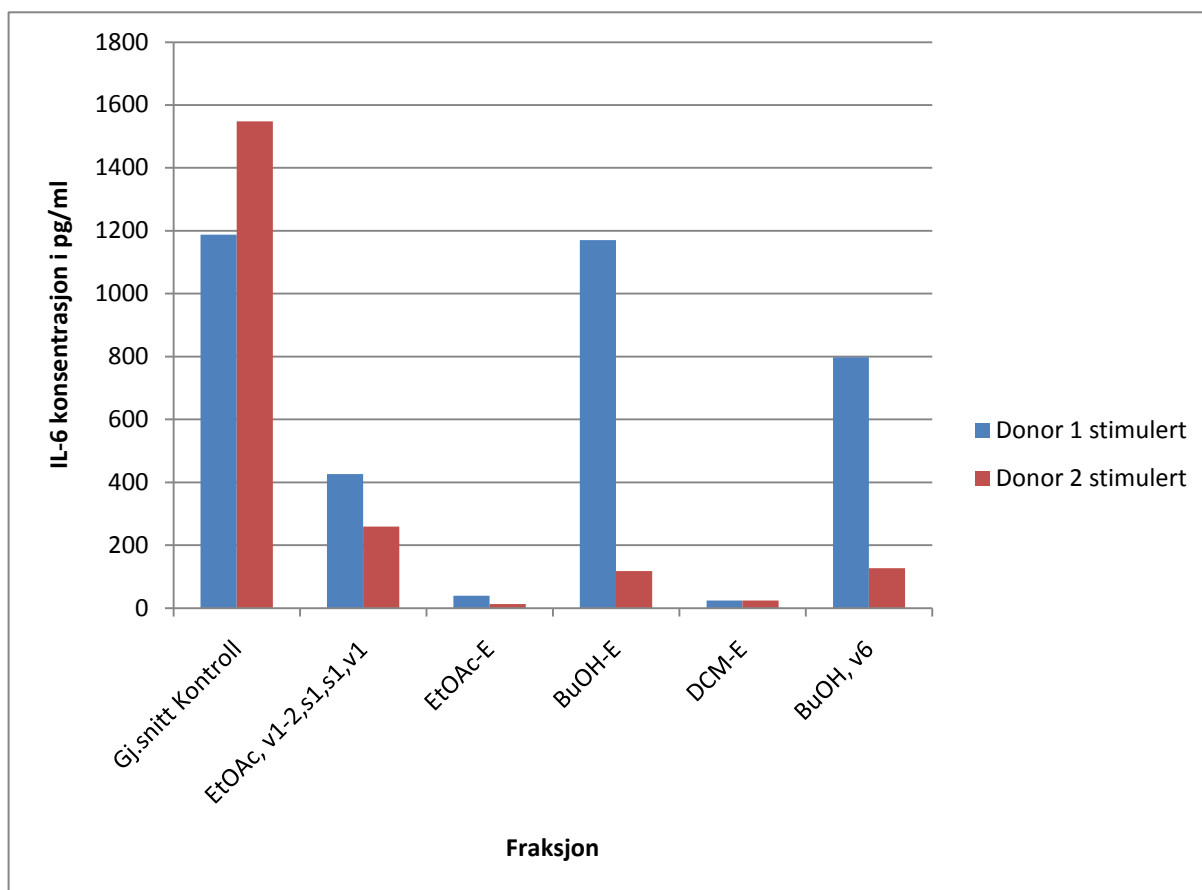
6.5.20 DCM, v6,v1,rp3

NMR-spekteret av DCM, v6,v1,rp3 så ut til å ligne vaniljesyre. Derfor ble vaniljesyre og isovaniljesyre analysert på analytisk HPLC og ^1H -spekter tatt. Det viste seg at DCM, v6,v1,rp3 analytisk HPLC samsvarte godt med vaniljesyre, men NMR-spekteret viste at stoffet allikevel ikke var vaniljesyre. (Se NMR-spektrum 38-39, s. 120-121).

6.6 Fullblodassay og ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)

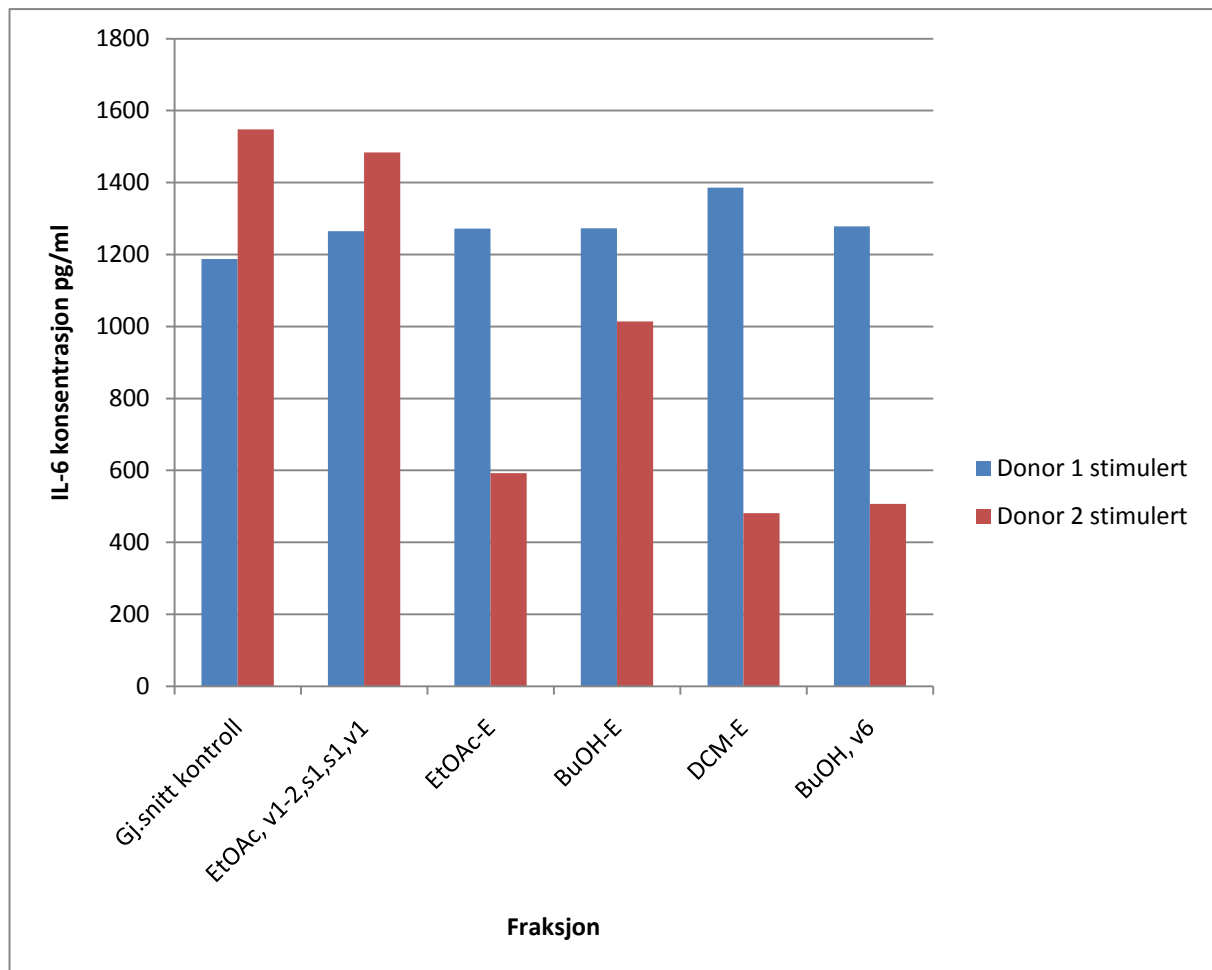
Disse forsøkene, som beskrevet i eksperimentelldelen kap. 5.7, ble utført i Sør-Afrika. Det ble tatt blod fra 8 friske frivillige som skulle benyttes i forsøket. Etter at alle de forberedende delene av forsøkene var fullført og resultatdelen nærmet seg slutten (de siste trinnene av ELISA) ble det oppdaget at flere essensielle reagenser manglet. Derfor var det bare mulig å få resultatene fra 2 friske frivillige.

For å undersøke om de medbrakte ekstraktene og fraksjonene fra *T. alliacea* hadde pro- eller antiinflammatorisk effekt ble prøvene tilsatt normalt, friskt blod og blod tilsatt PHA (phytohaemagglutinin) som ville etterligne en inflammasjonstilstand i blodet. Hvis fraksjonene hadde proinflammatoriske egenskaper ville det observeres en økning av IL-6 konsentrasjonen. Hvis prøvene hadde antiinflammatorisk effekt ville det observeres en reduksjon av IL-6 konsentrasjonen.



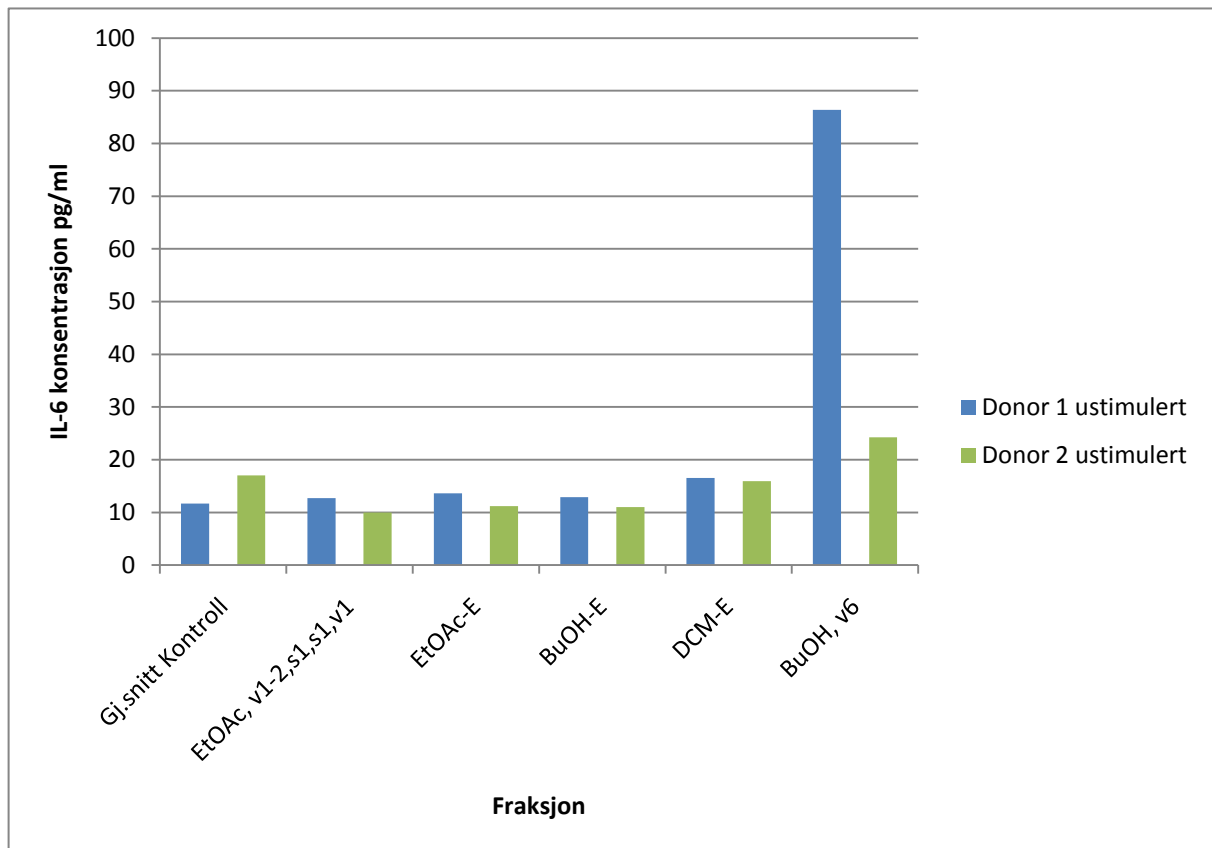
Figur 13. Endring i IL-6 konsentrasjonen ved tilsetning av PHA ved 1,0 mg/ml planteekstrakt.

De første 2 kolonnene i figur 13 er gjennomsnittet av kontroller fra hver fraksjon. Dette vil gi en indikasjon på hvilken IL-6 konsentrasjon en finner uten tilsetning av plantemateriale. Responsen ved tilsetning av plantemateriale gir stor variasjon mellom de to forskjellige donorene. Allikevel er det tydelig at EtOAc-E og DCM-E er kraftig antiinflammatorisk. IL-6 konsentrasjonen er tilnærmet lik den en finner i forsøket uten tilsatt PHA. Det ser også ut som donor 2 responderer bedre på behandlingen enn donor 1. Det er rimelig å anta at det er store individuelle variasjoner i respons.



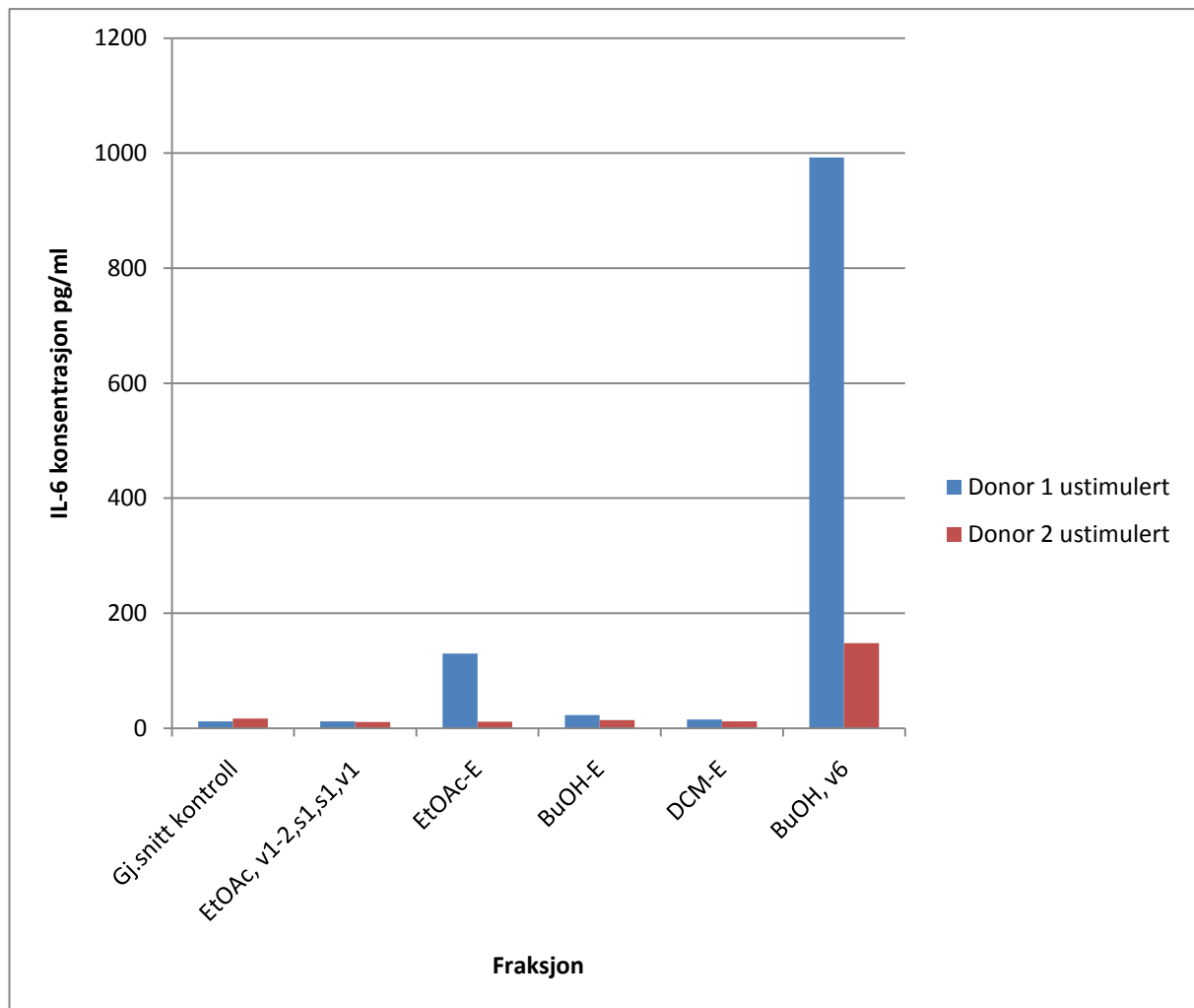
Figur 14. Endring i IL-6 konsentrasjonen ved tilsetning av PHA ved 250 $\mu\text{g/ml}$ planteekstrakt.

Etter tilsetning av prøveløsning i konsentrasjon 250 $\mu\text{g/ml}$ (figur 14) er det som ved 1 mg/ml også her store forskjeller i effekt, men IL-6 konsentrasjonen har endret seg lite. Det synes derfor å være en konsentrasjonsavhengig effekt. Igjen er det donor 2 som responderer best på behandlingen og det er EtOAc-E og DCM-E som gir best resultat. Det ser ut som en må ha ganske høy konsentrasjon av ekstraktene før en senkning av IL-6 konsentrasjonen vil finne sted.



Figur 15. Endring i IL-6 konsentrasjonen uten tilsetning av PHA ved 1,0 mg/ml planteekstrakt.

I testen hvor PHA ikke ble tilsatt og inflammasjon ikke ble indusert, viste BuOH, v6-fraksjonen å gi høyere IL-6-konsentrasjon i forhold til de andre prøvene (figur 15). Betydelig høyere verdier enn kontrollen kan tilsa at fraksjonen har proinflammatoriske egenskaper. Siden donor 2 har mye lavere IL-6 konsentrasjon ved BuOH, v6 enn donor 1, kan donor 1 sin forhøyede verdi komme fra individuelle variasjoner eller usikkerheter ved analysen.



Figur 16. Endring i IL-6 konsentrasjonen uten tilsetning av PHA ved 250 µg/ml planteekstrakt.

Det er tydelig at BuOH, v6 øker konsentrasjonen av IL-6. Som observert ved tilsetning av PHA har donor 2 generelt høyere nivå av IL-6 også ved en konsentrasjon på 250 µg/ml testsubstans (figur 16). Det samme observeres her uten tilsatt PHA. Prosedyren for å komme fram til disse resultatene inneholder mange steg og dermed er muligheten for å gjøre feil til stede. I tillegg er det store individuelle forskjeller knyttet til bruk av blod fra forskjellige pasienter. Det var derfor ønskelig å bruke blod fra 8 forskjellige personer, men dette var som sagt ikke mulig, siden essensielle reagenser ikke kunne skaffes i tide.

7. Konklusjon

Metanolekstraktet av oppkuttet og tørket rot av *Tulbaghia alliacea* hadde relativt lav radikalfangede- og xantinoksidasehemmende effekt.

Diklormetaneekstraktet hadde noe høyere xantinoksidasehemmende effekt enn metanolekstraktet, men lavere radikalfangende effekt. To stoff ble identifisert, ferulasyre og 2*R*,3*R*-2-*C*-metyl-erytronolakton. Ferulasyre er et relativt vanlig naturstoff, men 2*R*,3*R*-2-*C*-metyl-erytronolakton er sjelden. I tillegg ble noen av strukturelementene fra et tredje, svovelholdig stoff identifisert.

Diklormetanrækstraktet var den fraksjonen, sammen med etylacetatekstraktet, som viste kraftigste interleukin-6-hemming.

Etylacetatfasen av metanolekstraktet inneholdt to sannsynlige stoffer, 1-deoksy-1-metylamino-3,6-(1,2-dihydroksyetyliden)-*D*-glukose og scopoletin. Begge disse molekylene er sannsynlige, men det mangler noe informasjon for å være helt sikker på innholdet. Fraksjonen som sannsynligvis inneholdt scopoletin var den kraftigste radikalfangende fraksjonen som ble testet.

2-propensyre, 2-metyl-3-[tetrahydro-2,3,5-trihydroxy-6-(hydroxymetyl)-2*H*-pyran-2-yl] ble isolert og identifisert fra butanolfasen av metanolrækstraktet. Dette molekylet er kun rapportert én gang tidligere og da i en marin svamp. Dette er første gang dette stoffet er identifisert fra en plante.

Marasmin, som er det eneste tidligere rapporterte stoffet fra *T. alliacea* ble ikke identifisert. Alle stoffene som ble identifisert i denne planten er nye stoff som ikke har blitt oppdaget tidligere i *T. alliacea*.

8. Vedlegg

8.1 Metoder HPLC

Metode 1

Tid i minutter	Mobilfase MeOH:vann	Flow-hastighet i ml/min
0,0	2:98	1,0
5,0	5:95	1,0
10,0	20:80	1,0
15,0	70:30	1,0
20,0	70:30	1,0
21,0	2:98	1,0
24,0	2:98	1,0

Metode 2

Tid i minutter	Mobilfase MeOH:vann	Flow-hastighet i ml/min
0,0	2:98	3,0
1,8	10:90	3,0
3,3	20:80	3,0
5,0	40:60	3,0
6,8	70:30	3,0
8,3	70:30	3,0
8,4	3:97	3,0
10,0	3:97	3,0

Metode 3

Tid i minutter	Mobilfase MeOH:vann	Flow-hastighet i ml/min
0,0	2:98	1,0
5,0	5:95	1,0
10,0	20:80	1,0
12,0	40:60	1,0
12,1	2:98	1,0
13,5	2:98	1,0

Metode 4

Tid i minutter	Mobilfase MeOH:vann	Flow-hastighet i ml/min
0,0	2:98	2,0
2,5	5:95	2,0
5,0	20:80	2,0
7,5	90:10	2,0
10,0	90:10	2,0
11,0	2:98	2,0
13,0	2:98	2,0

Metode 5

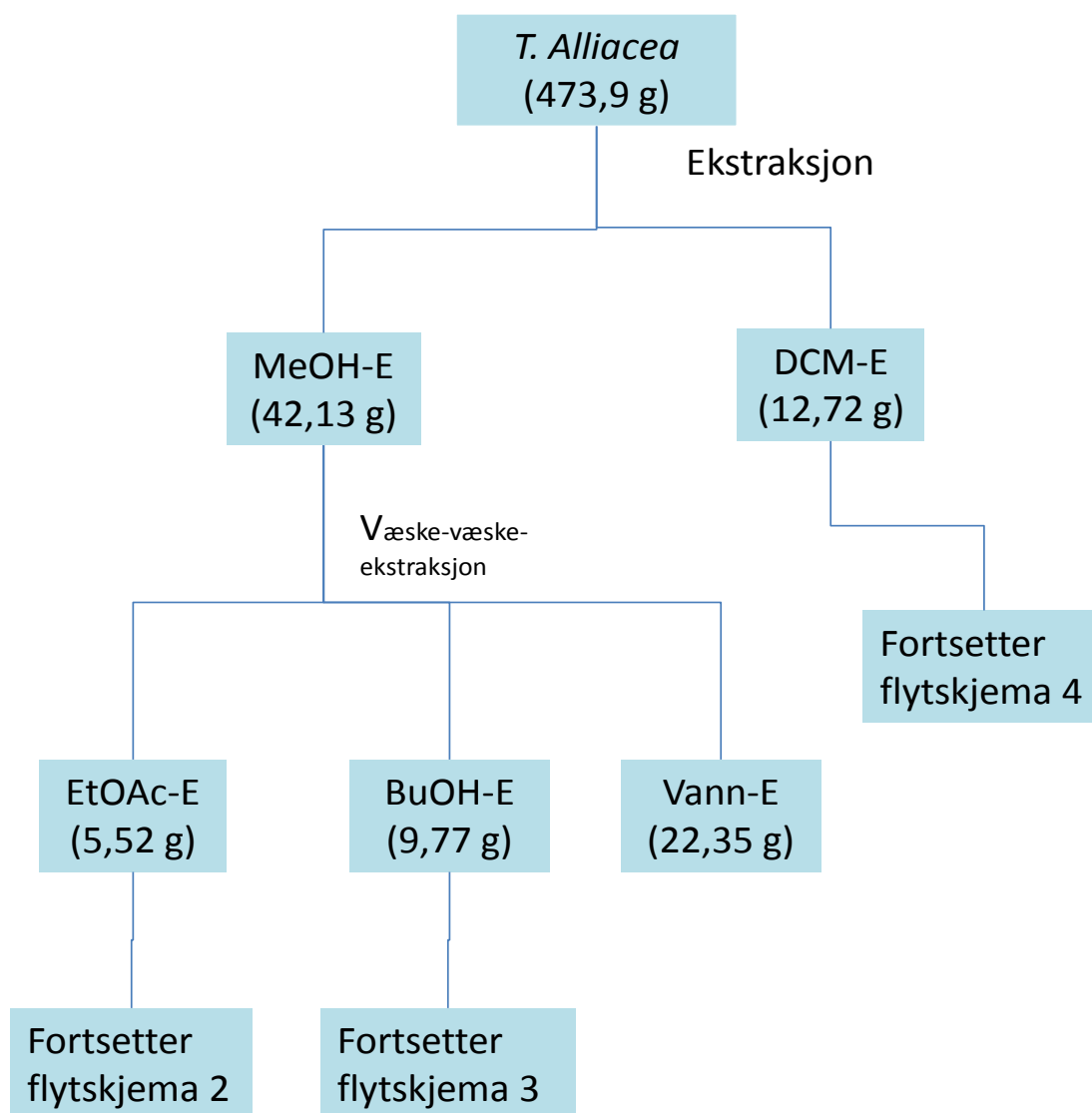
Tid i minutter	Mobilfase MeOH:vann	Flow-hastighet i ml/min
0,0	2:98	10 ml/min
2,3	5:95	10 ml/min
5	20:80	10 ml/min
10	90:10	10 ml/min
11	20:80	10 ml/min
13	20:80	10 ml/min

Metode 6

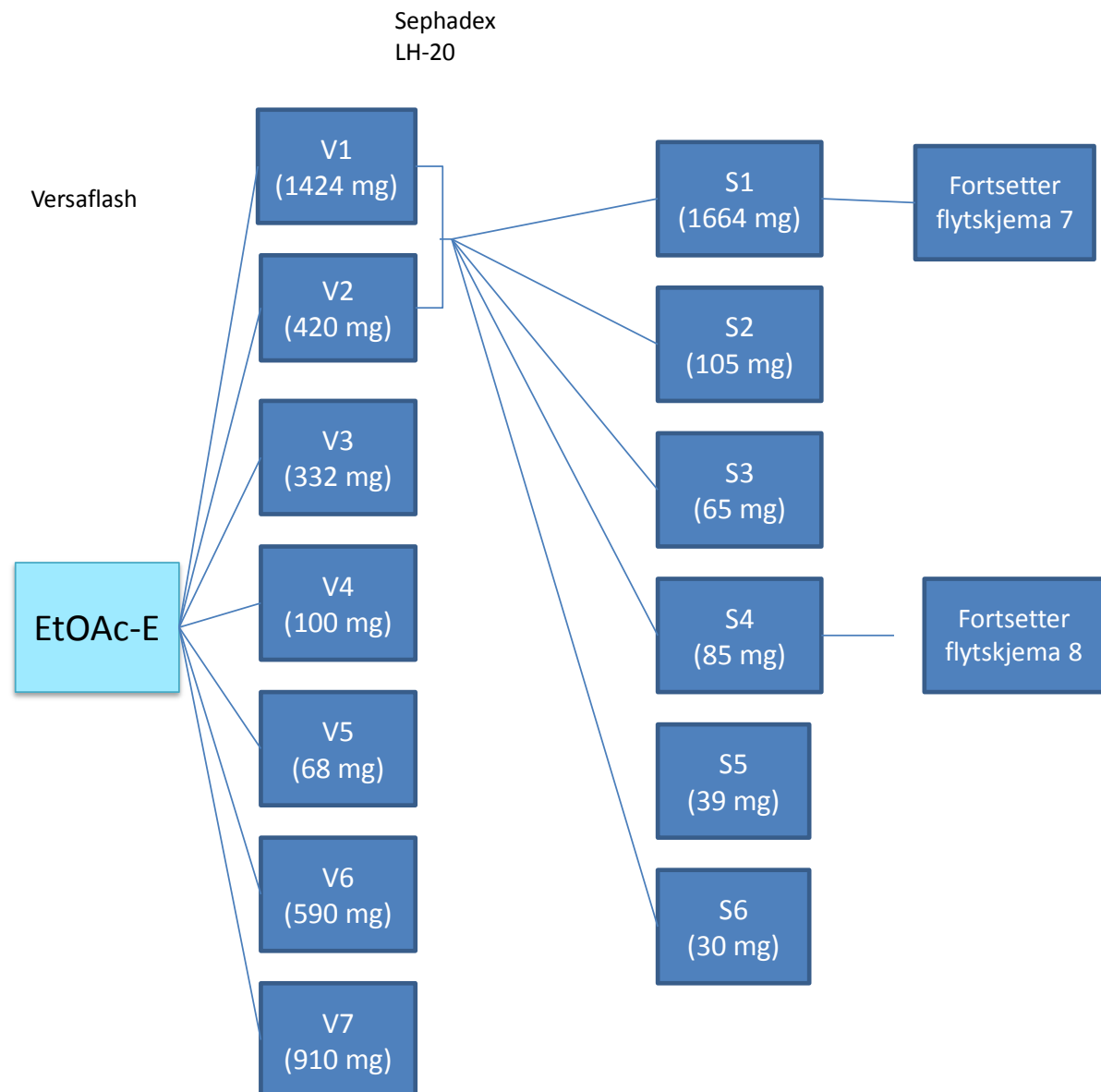
Tid i minutter	Mobilfase MeOH:vann	Flow-hastighet i ml/min
0,0	2:98	20 ml/min
2,0	5:95	20 ml/min
5	20:80	20 ml/min
10	90:10	20 ml/min
13	90:10	20 ml/min
14	20:80	20 ml/min
16	20:80	20 ml/min

8.2 Flytskjema

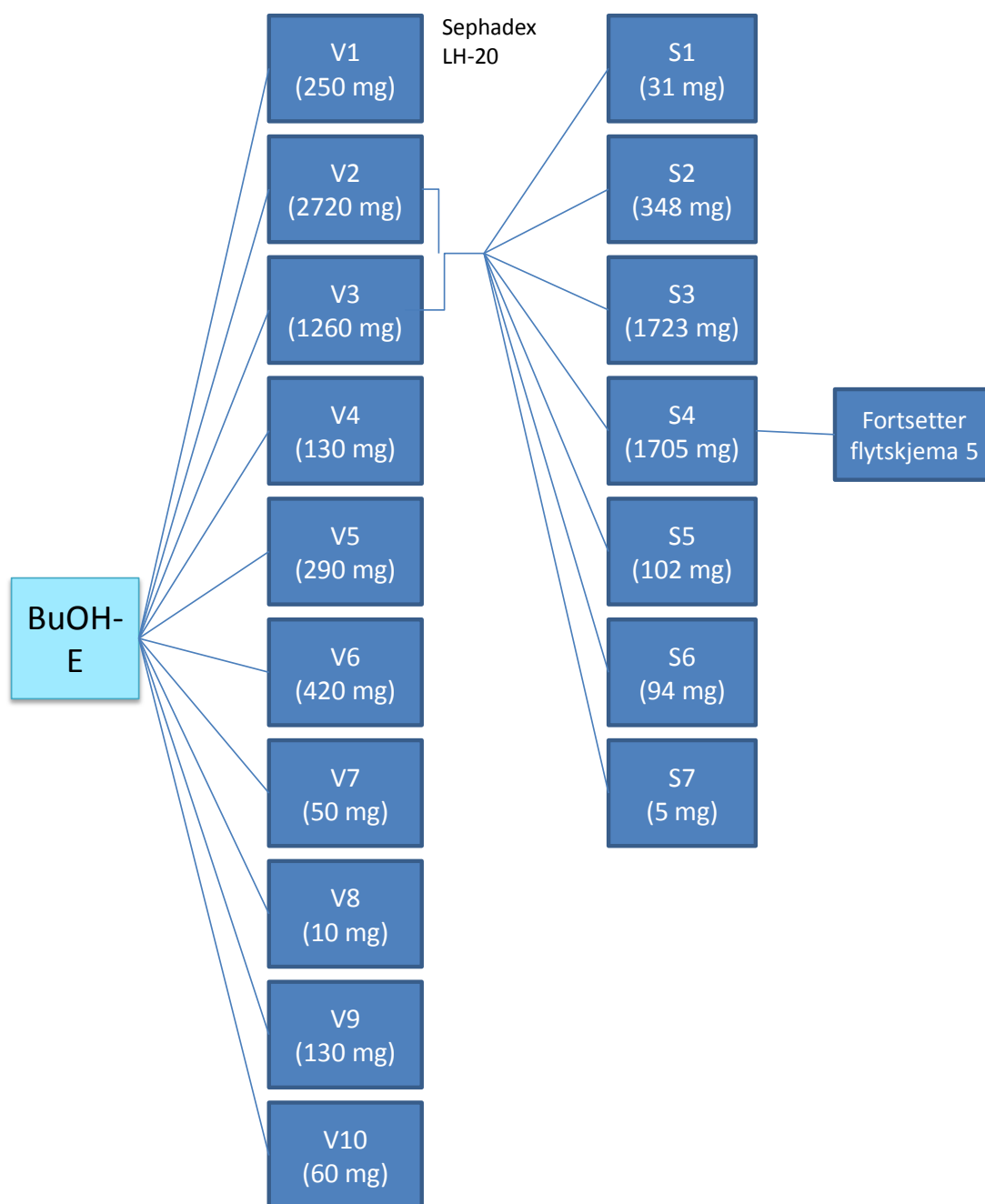
8.2.1 Flytskjema 1



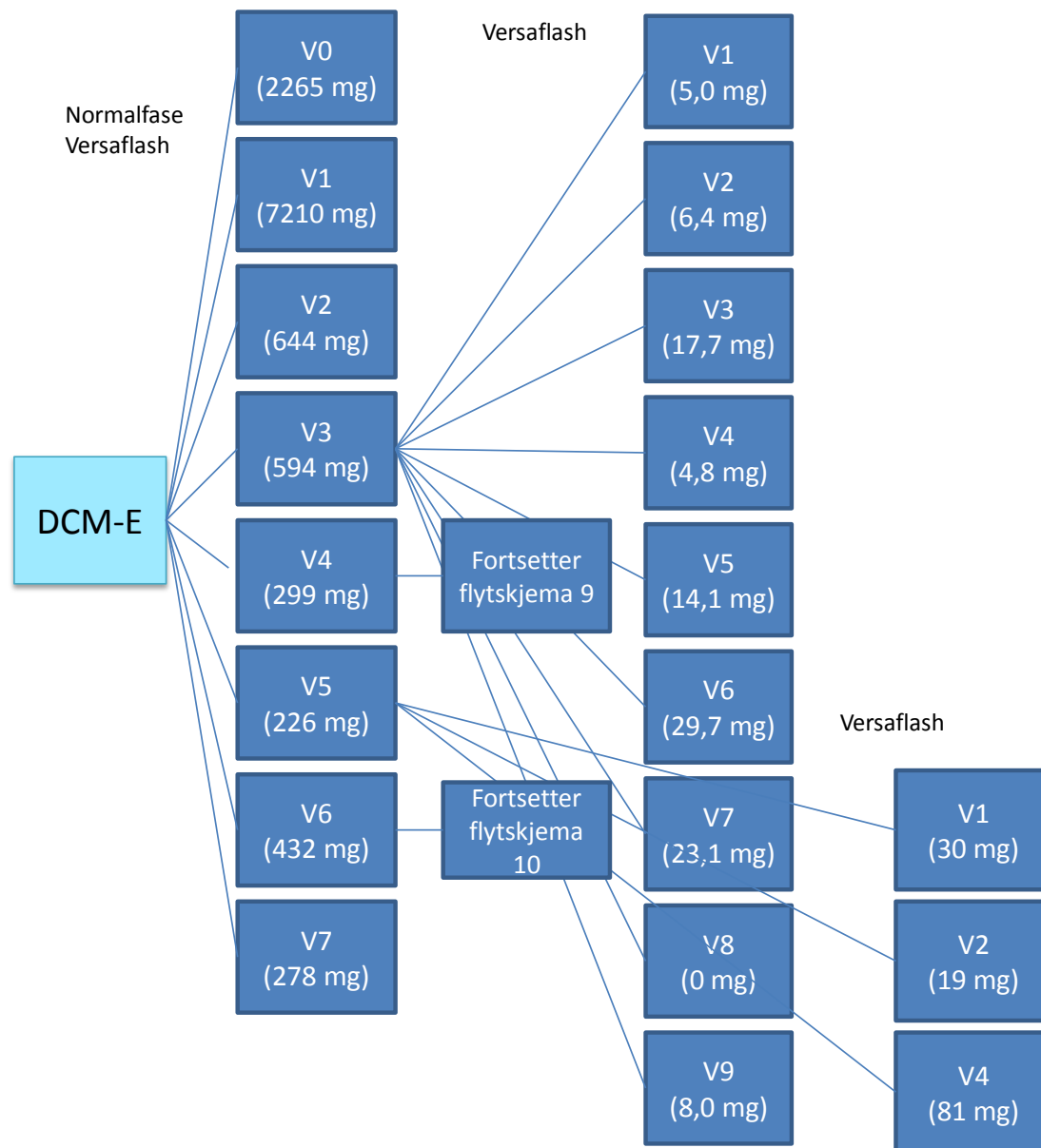
8.2.2 Flytskjema 2



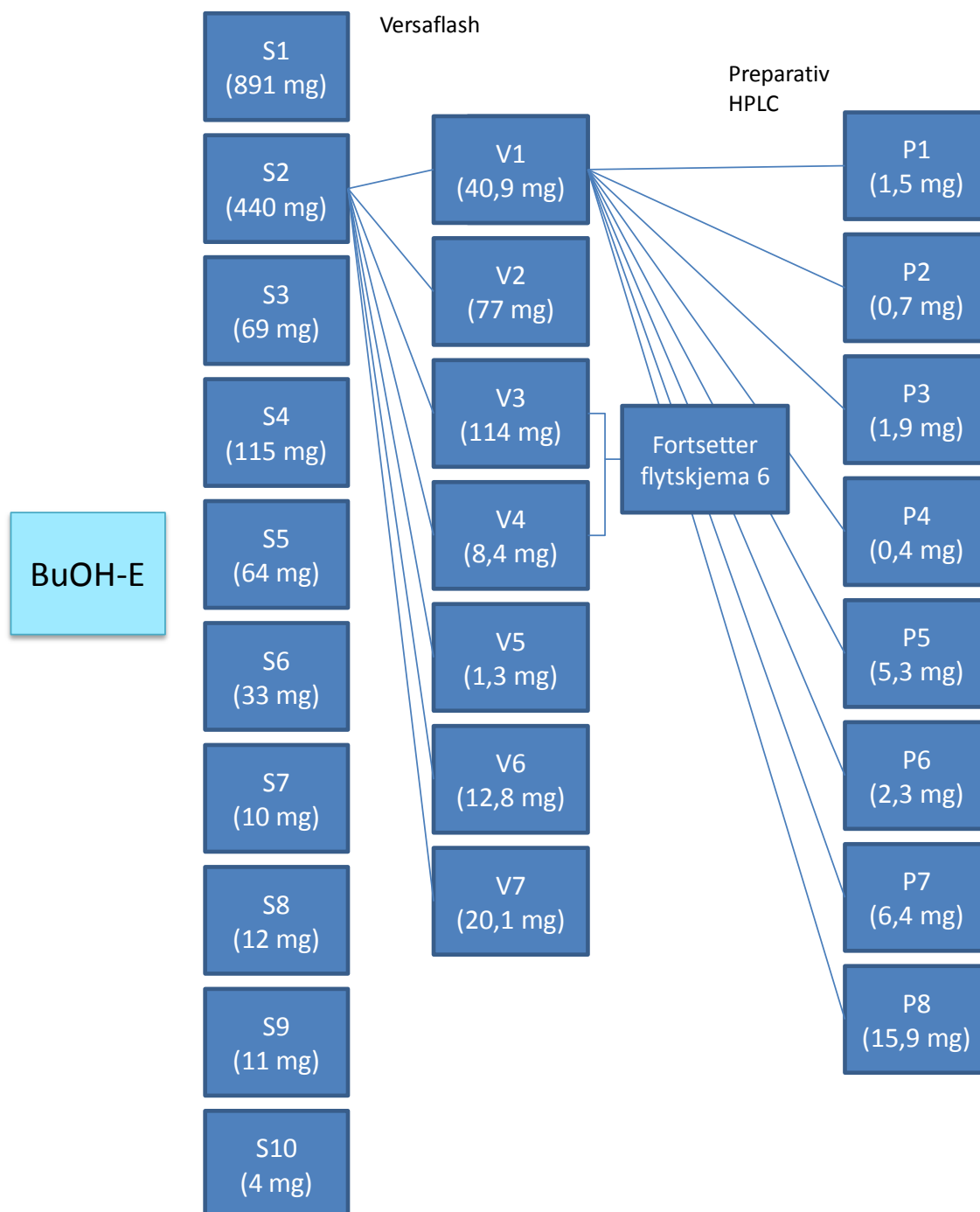
8.2.3 Flytskjema 3



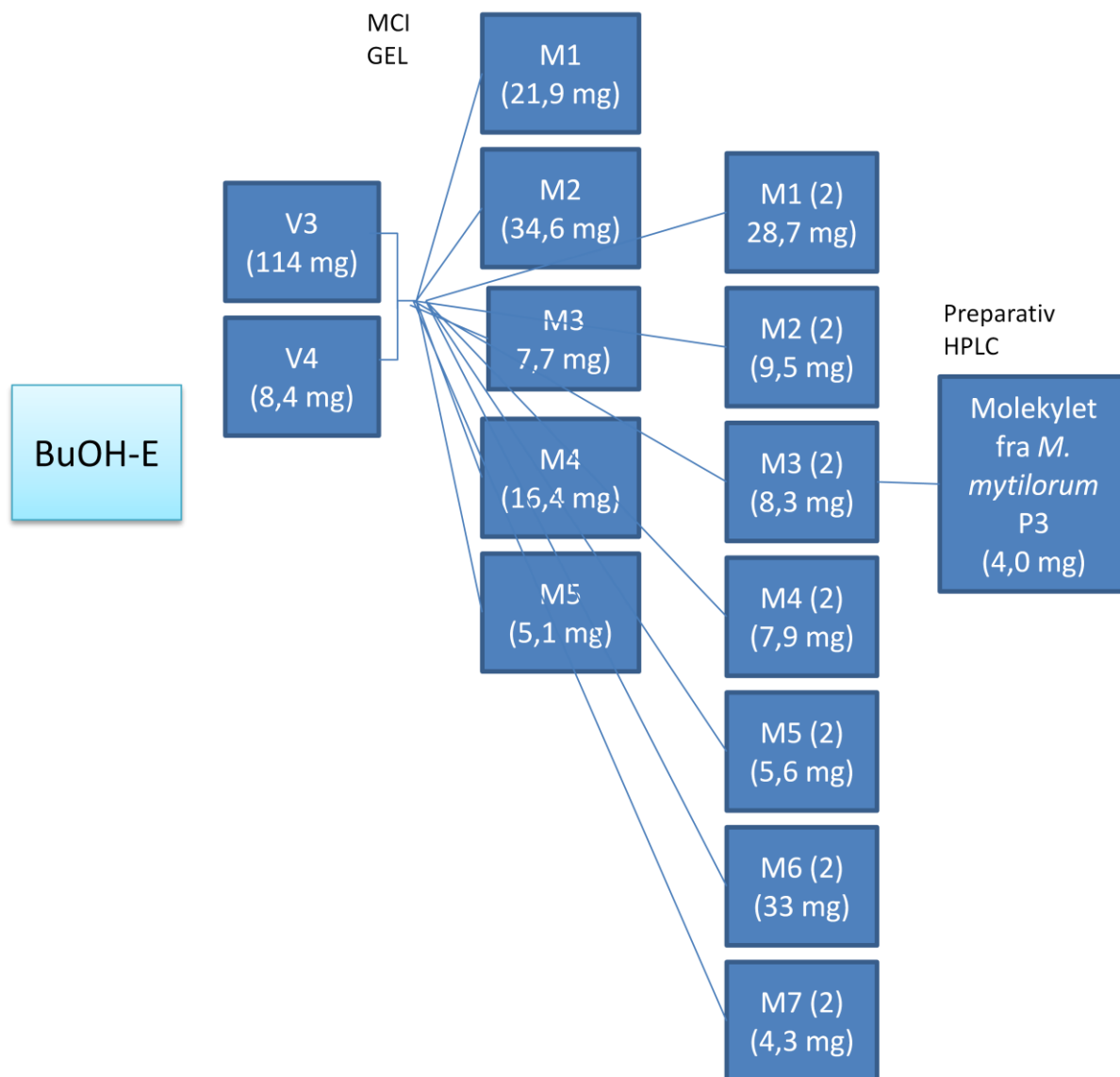
8.2.4 Flytskjema 4



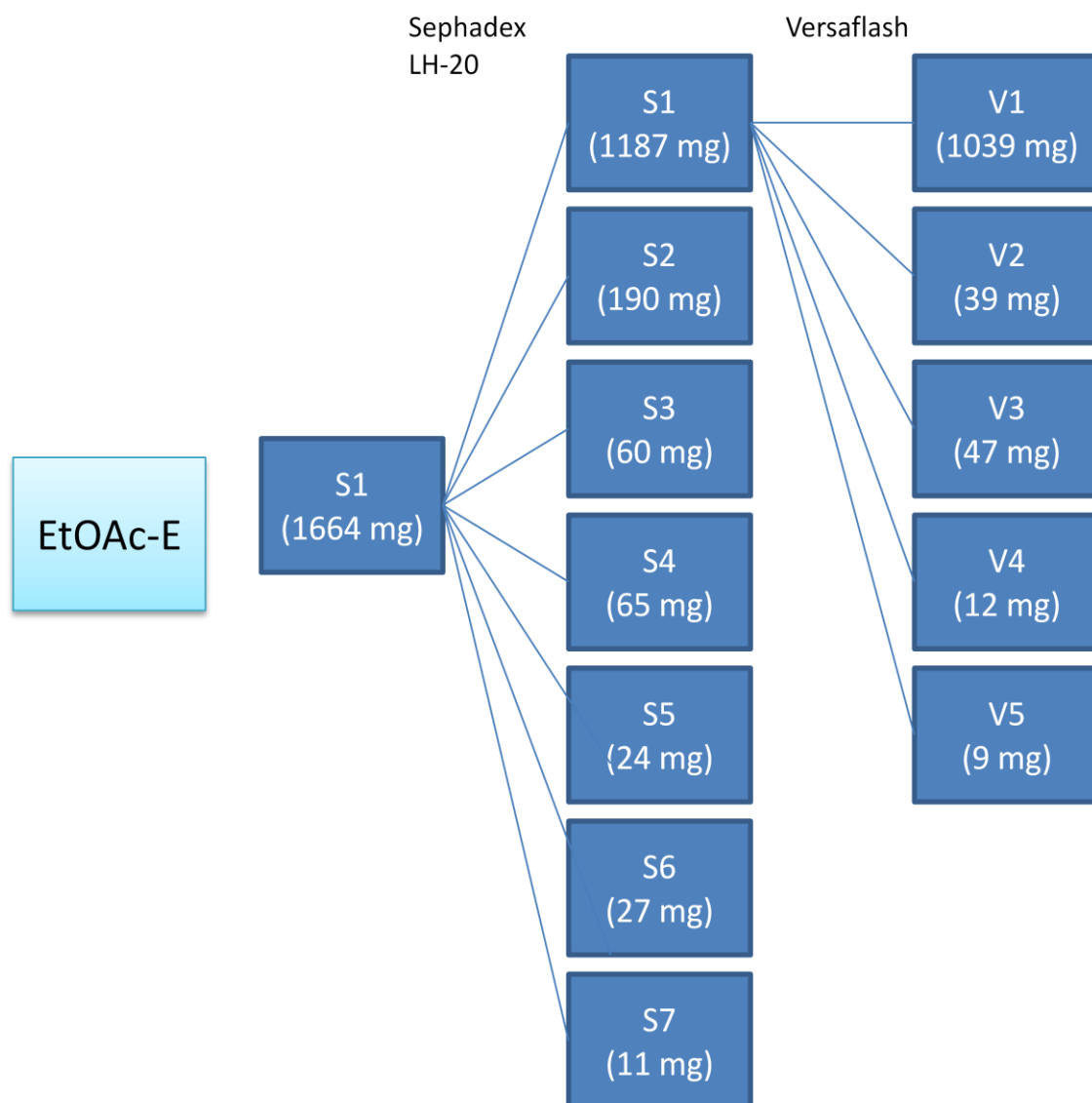
8.2.5 Flytskjema 5



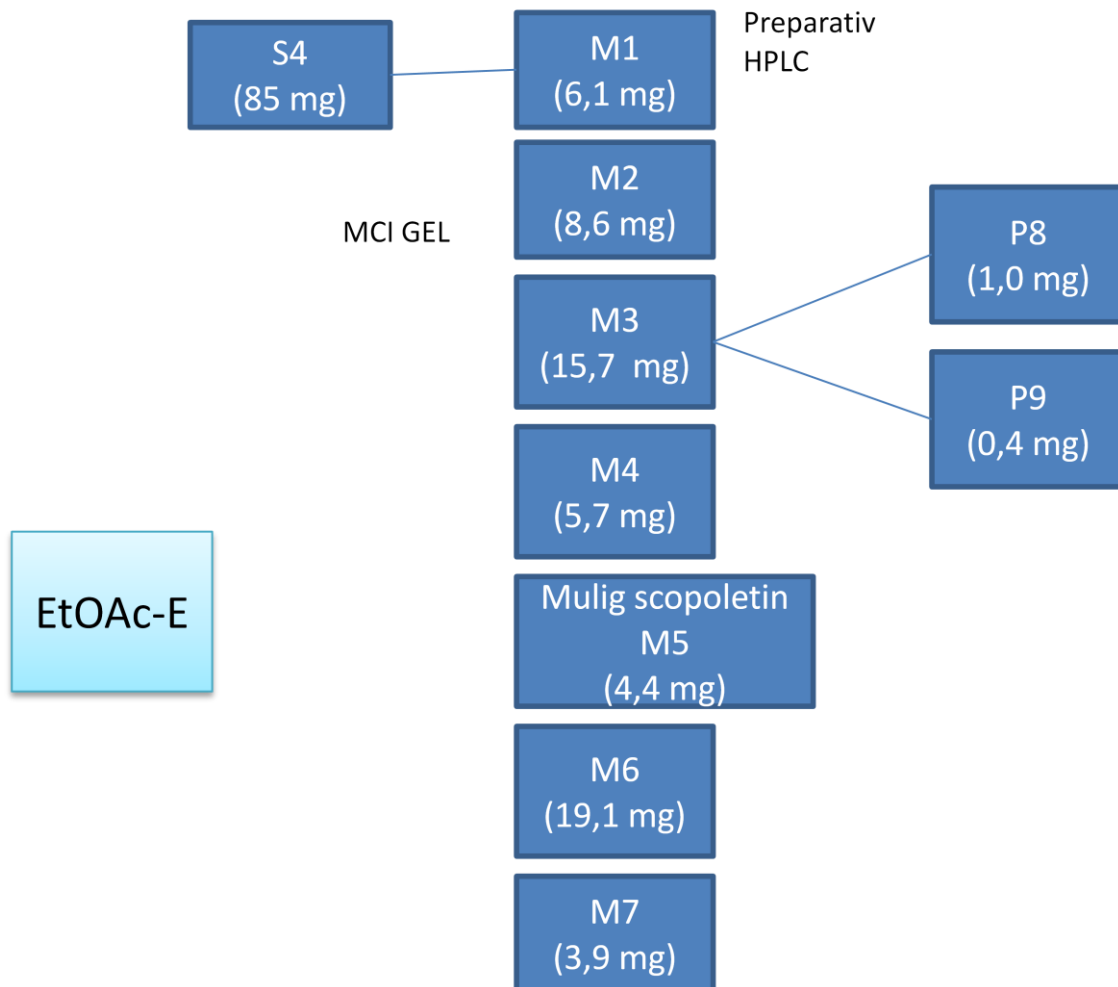
8.2.6 Flytskjema 6



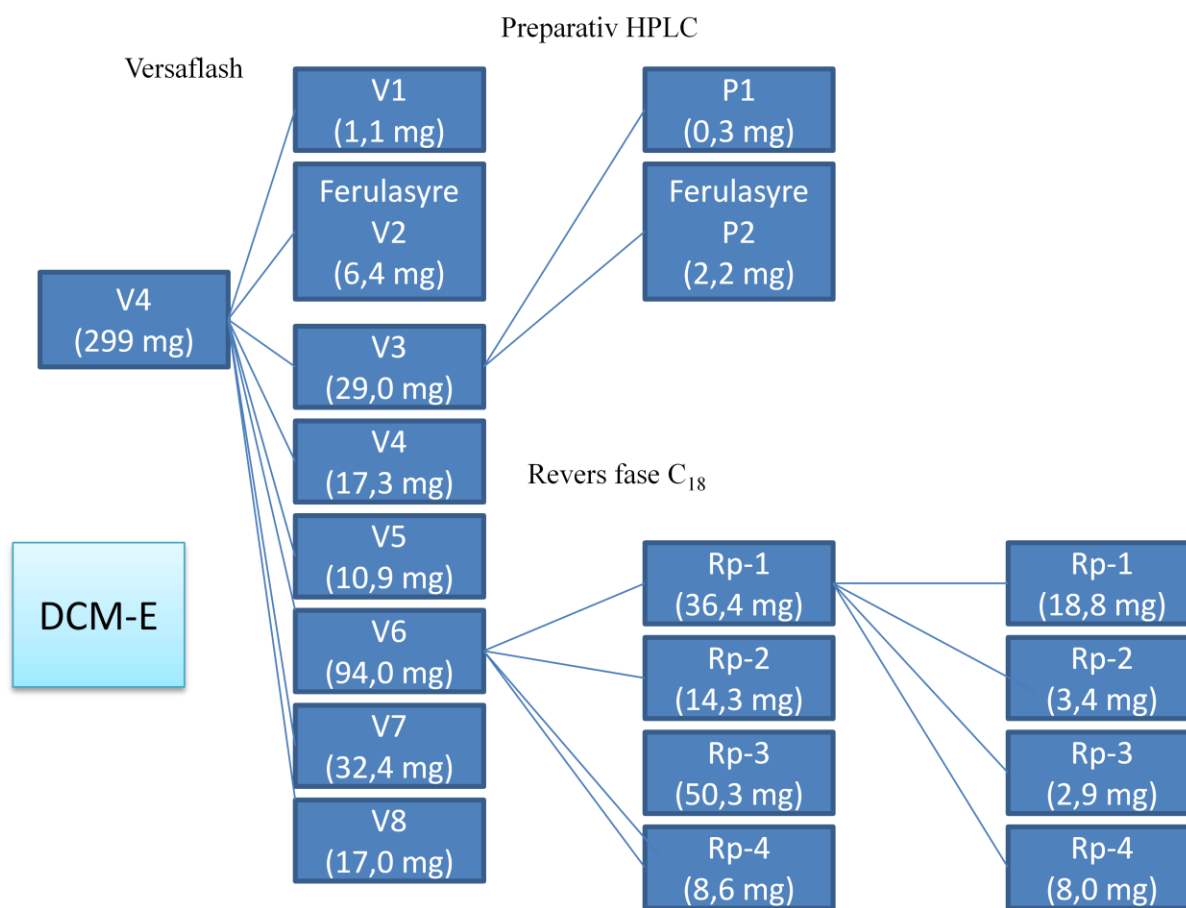
8.2.7 Flytskjema 7



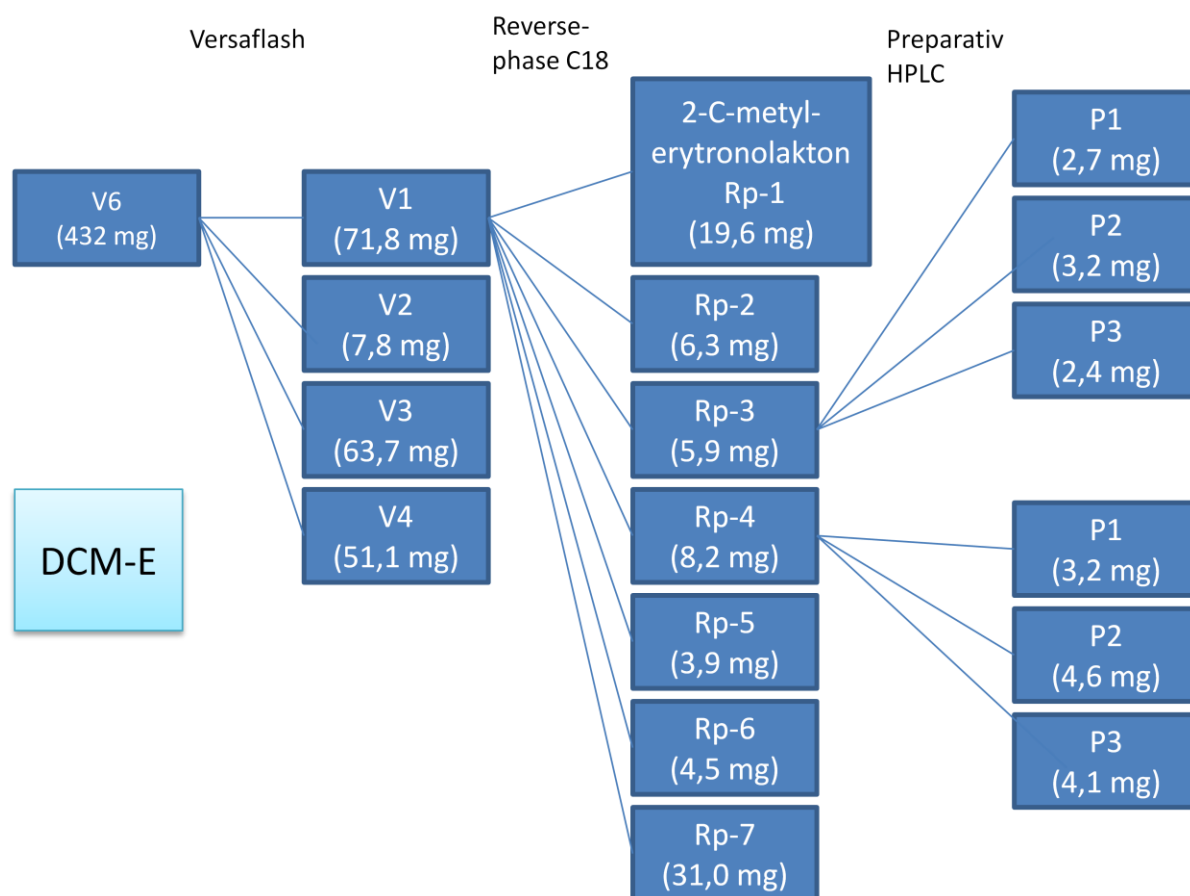
8.2.8 Flytskjema 8

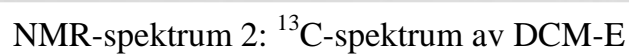
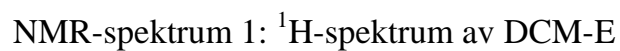


8.2.9 Flytskjema 9

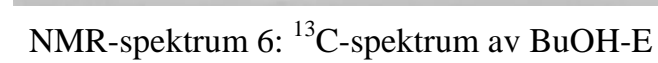
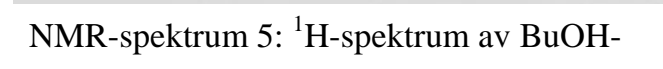


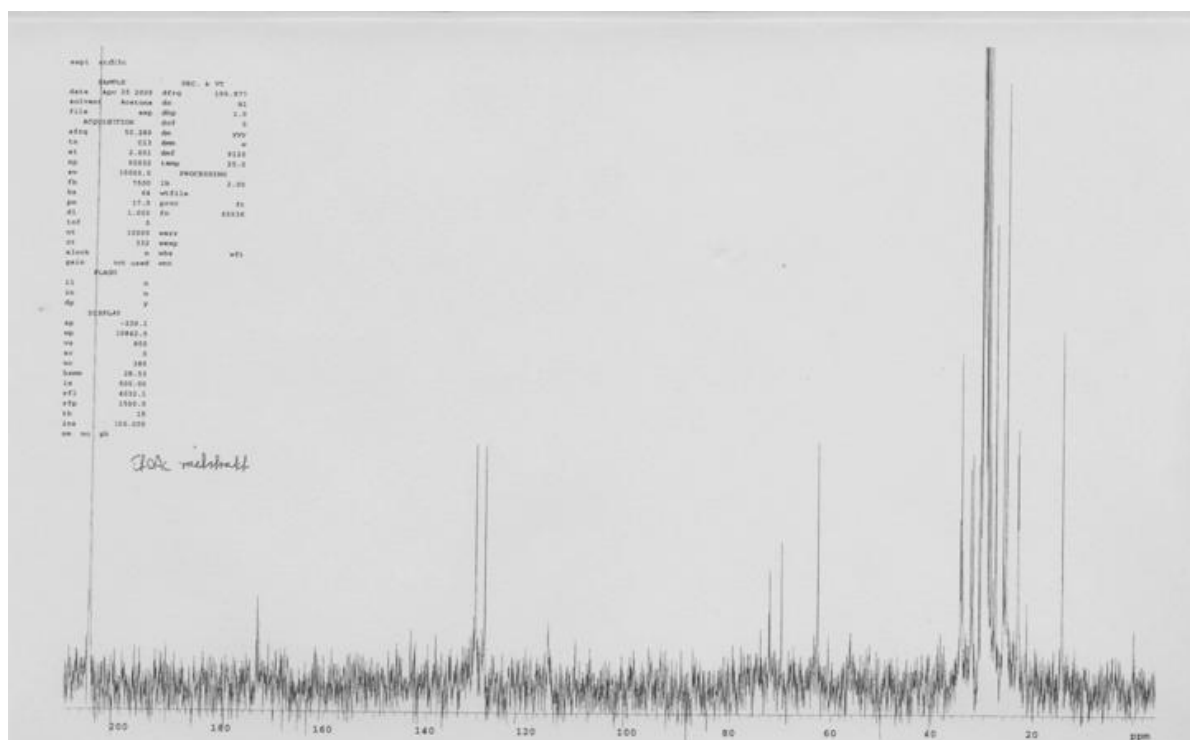
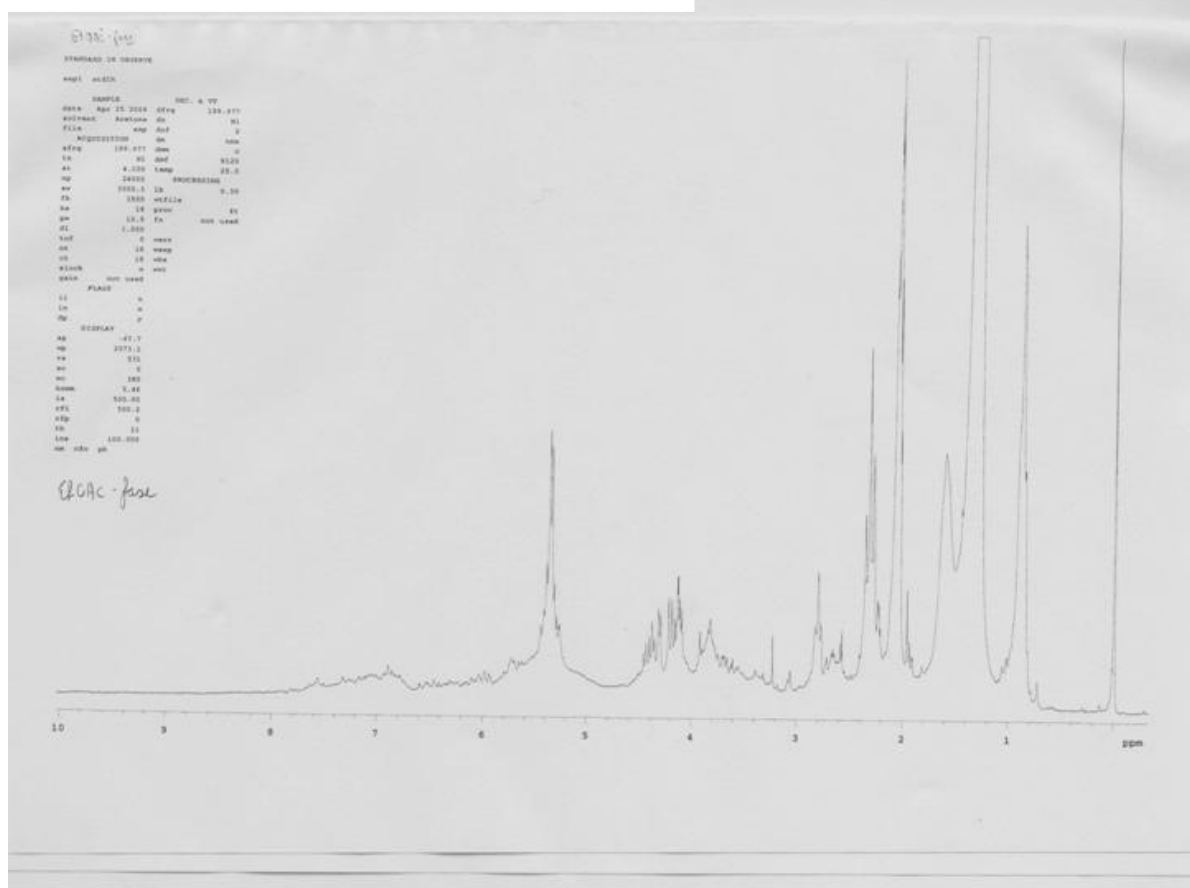
8.2.10 Flytskjema 10

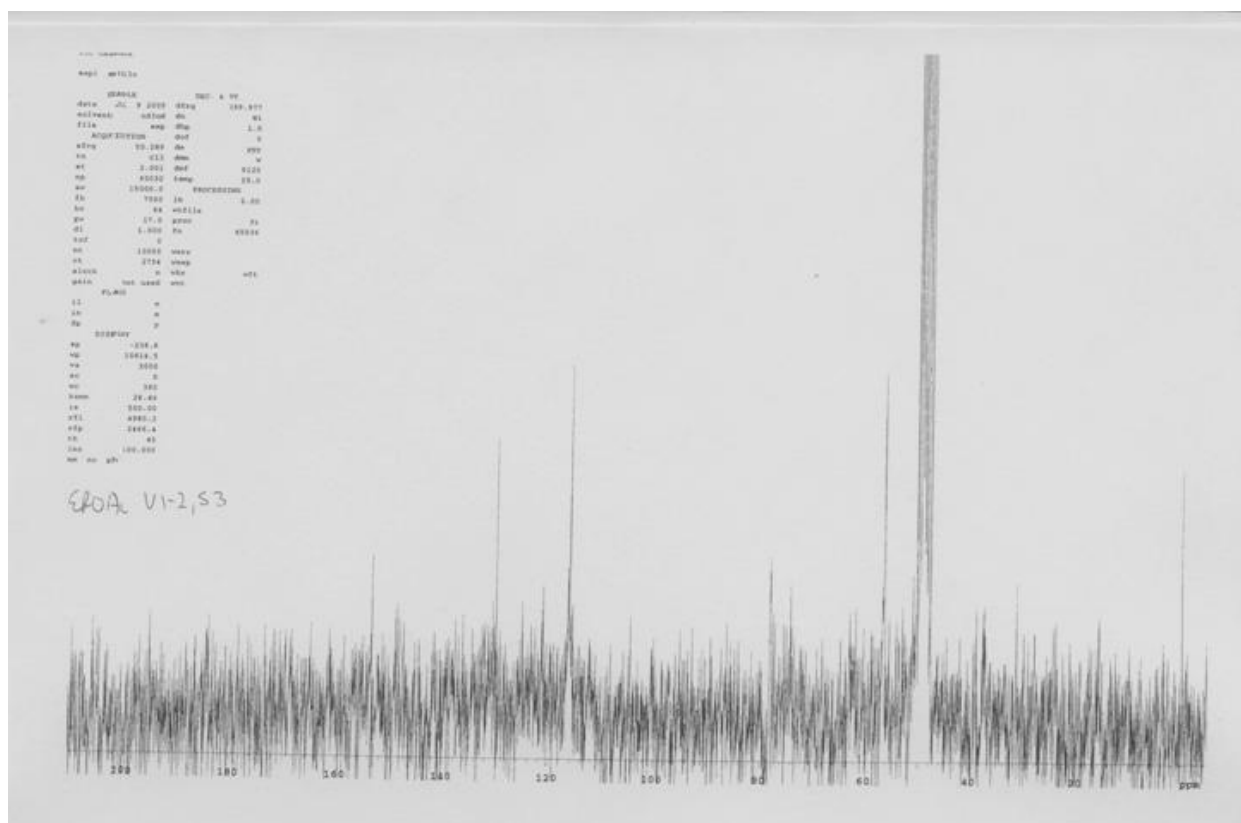
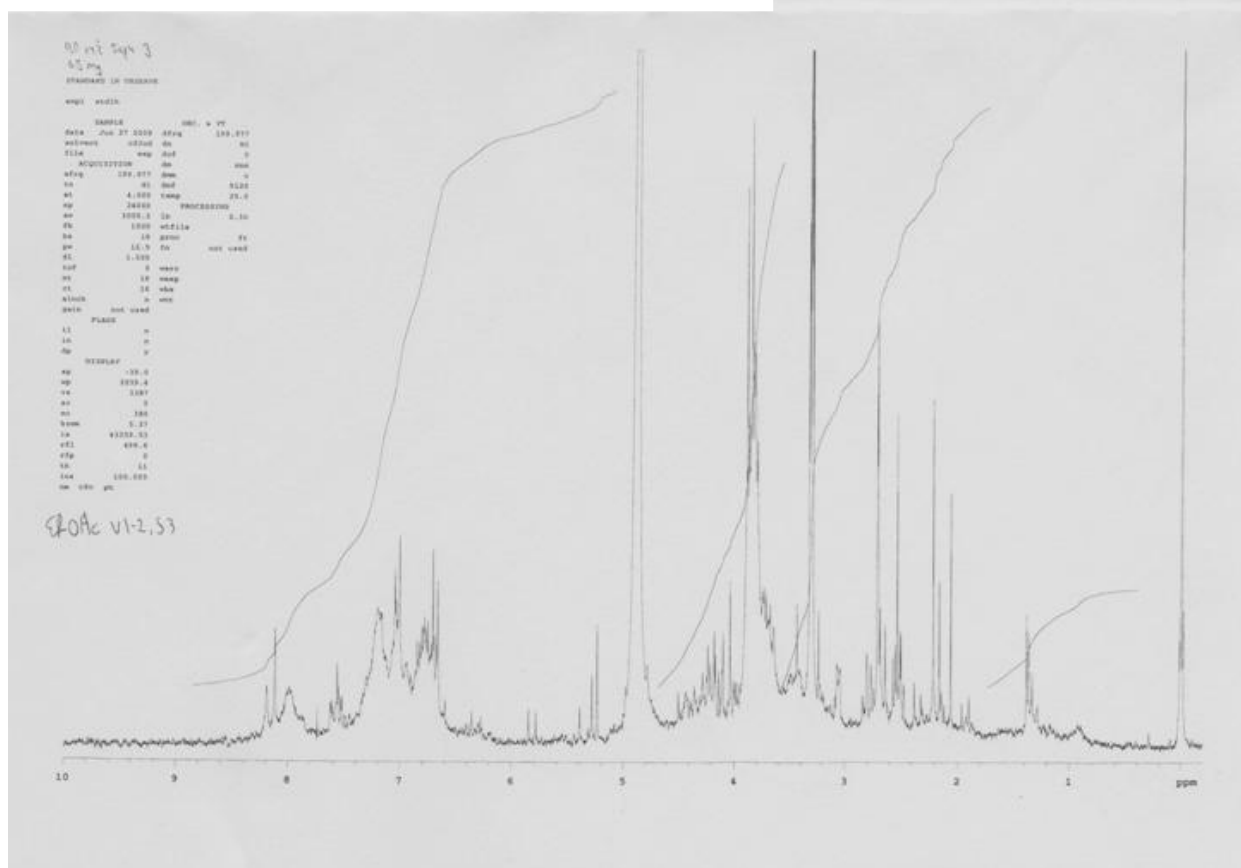


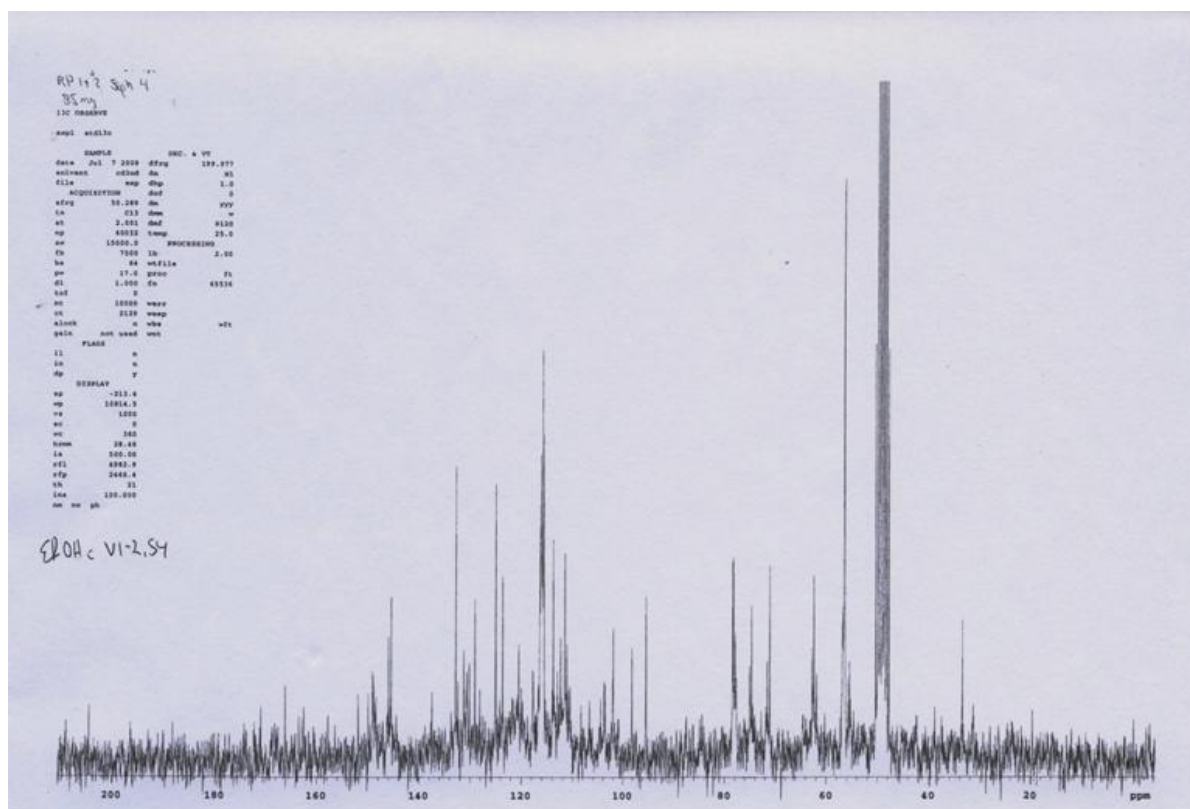
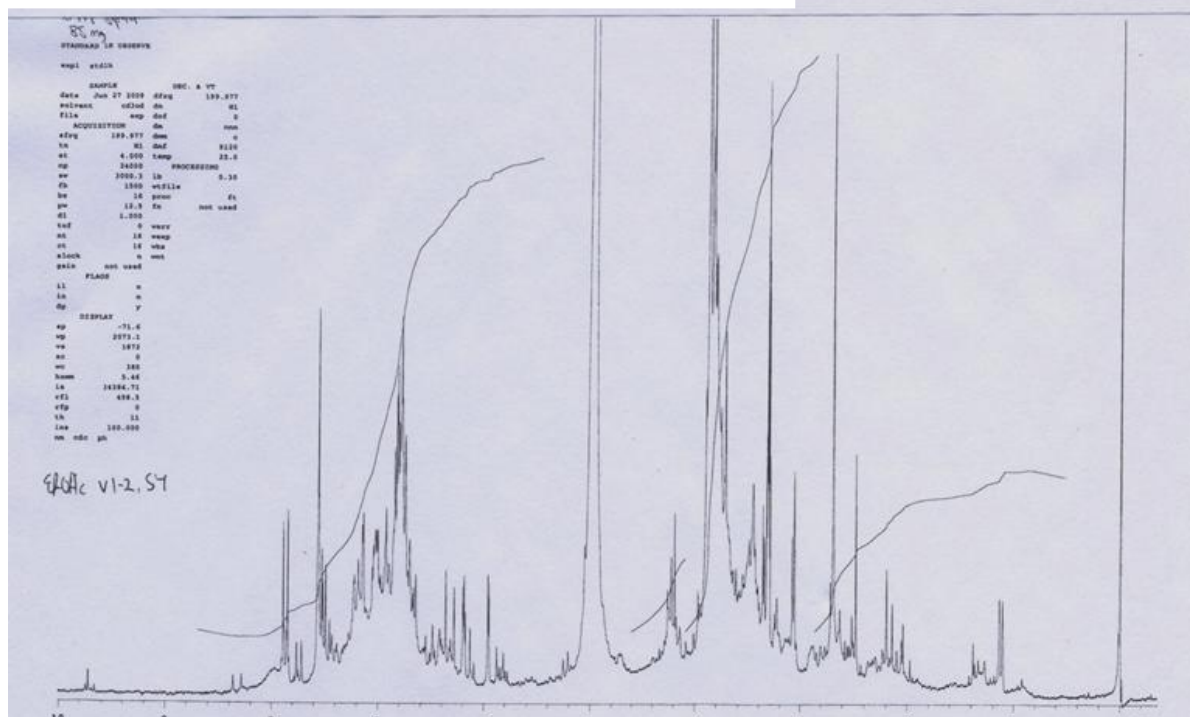


NMR-spektrum 4: ^1H -spektrum av MeOH-E

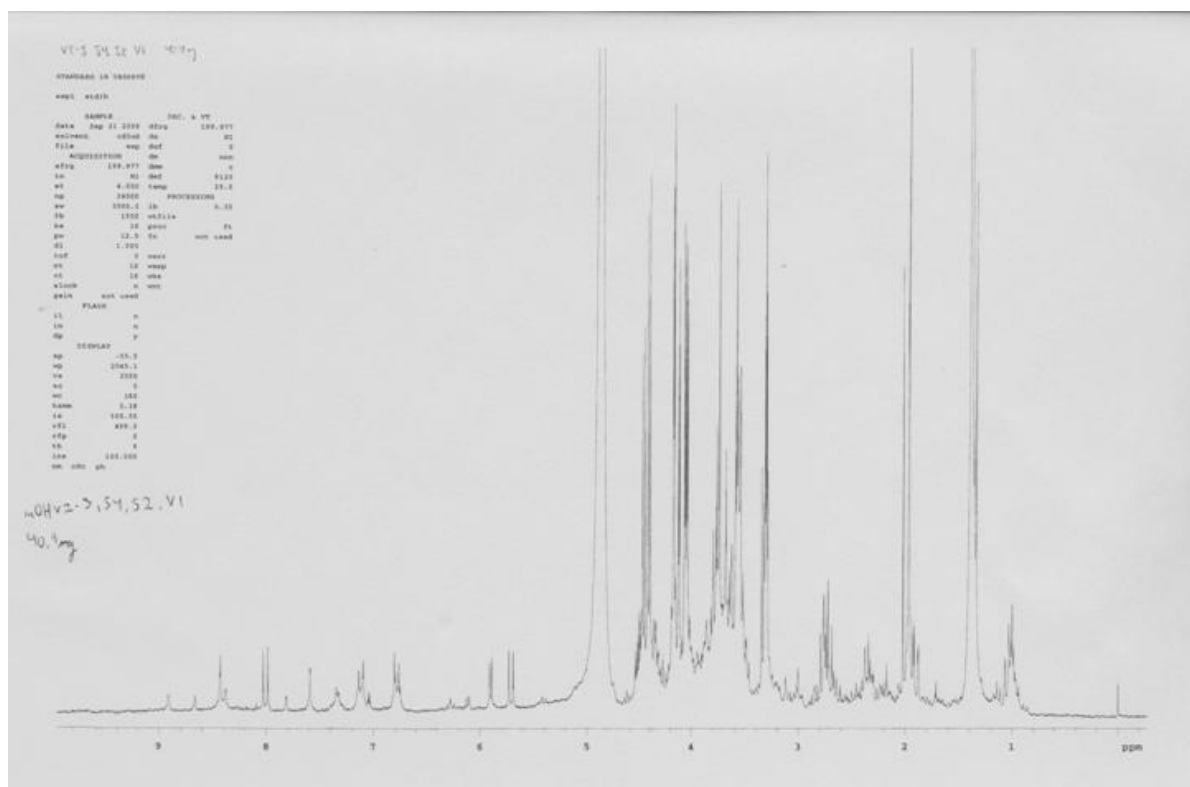
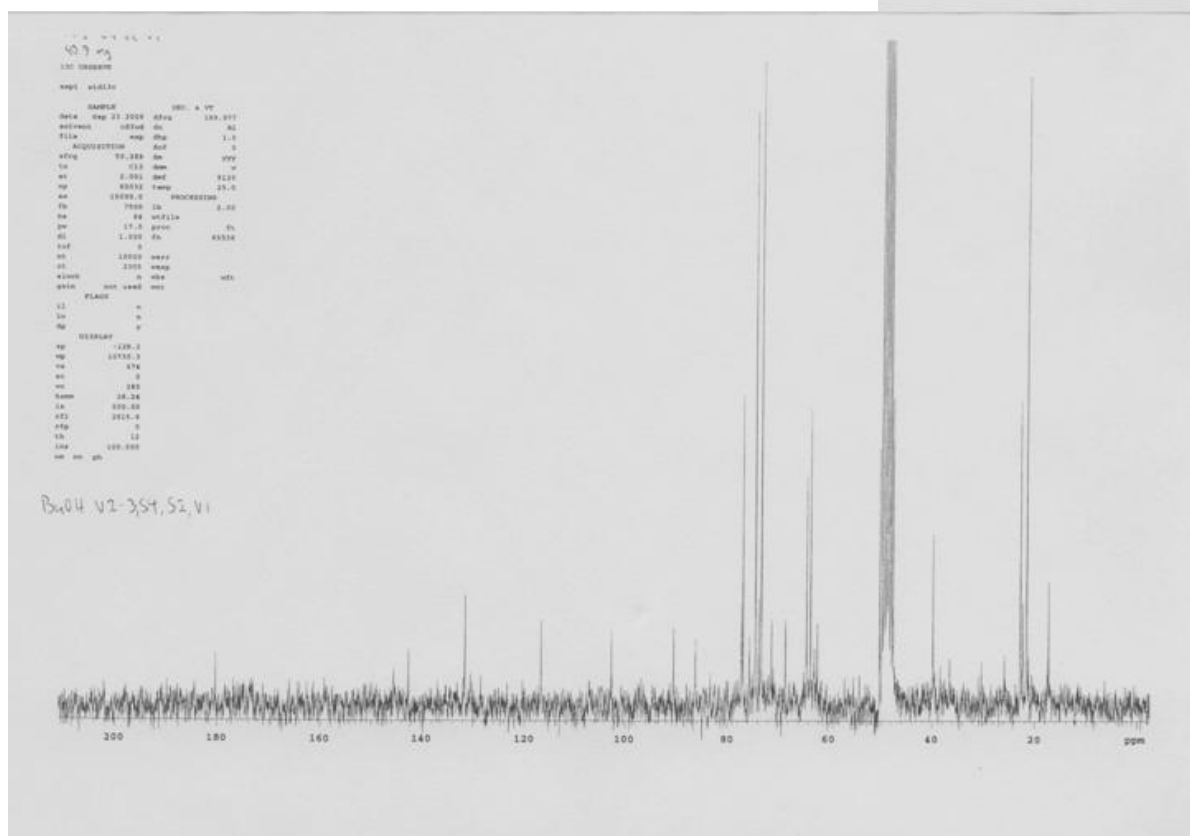


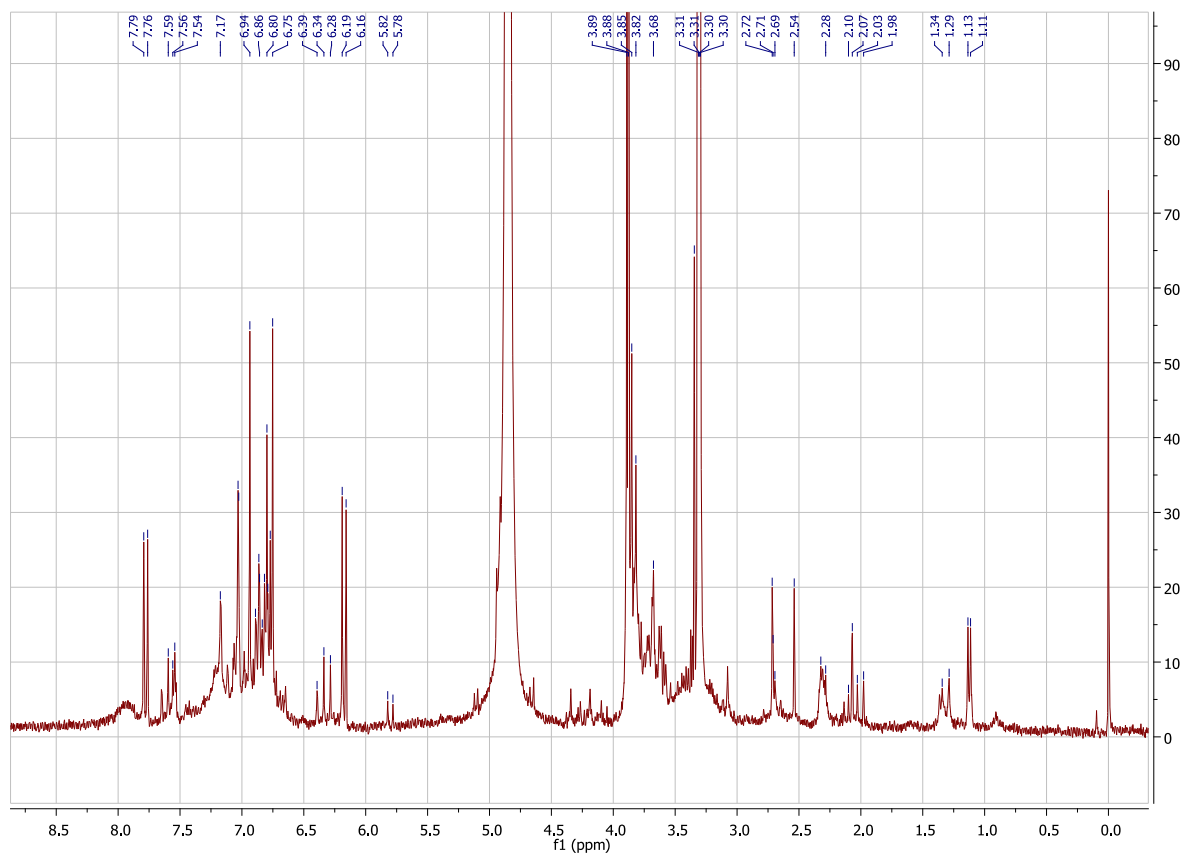
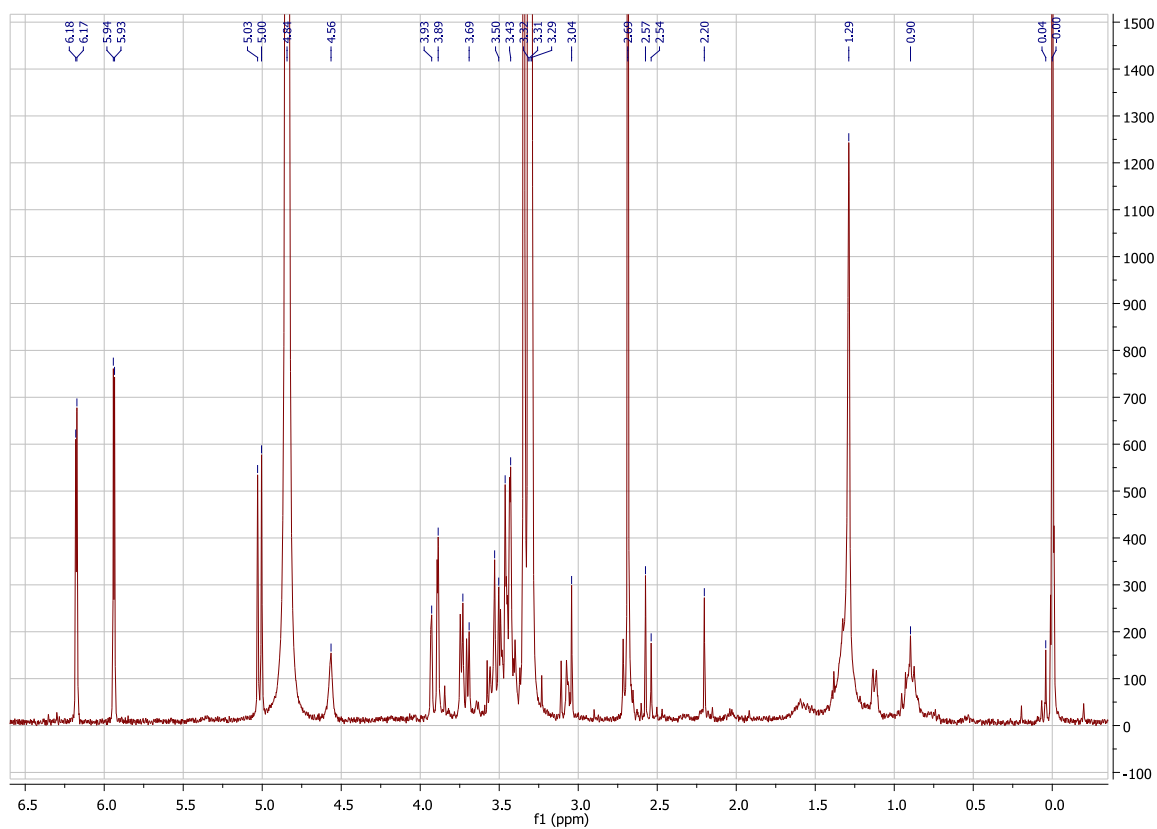
NMR-spektrum 7: ^{13}C -spektrum av EtOAc-ENMR-spektrum 8: ^1H -spektrum av EtOAc-E

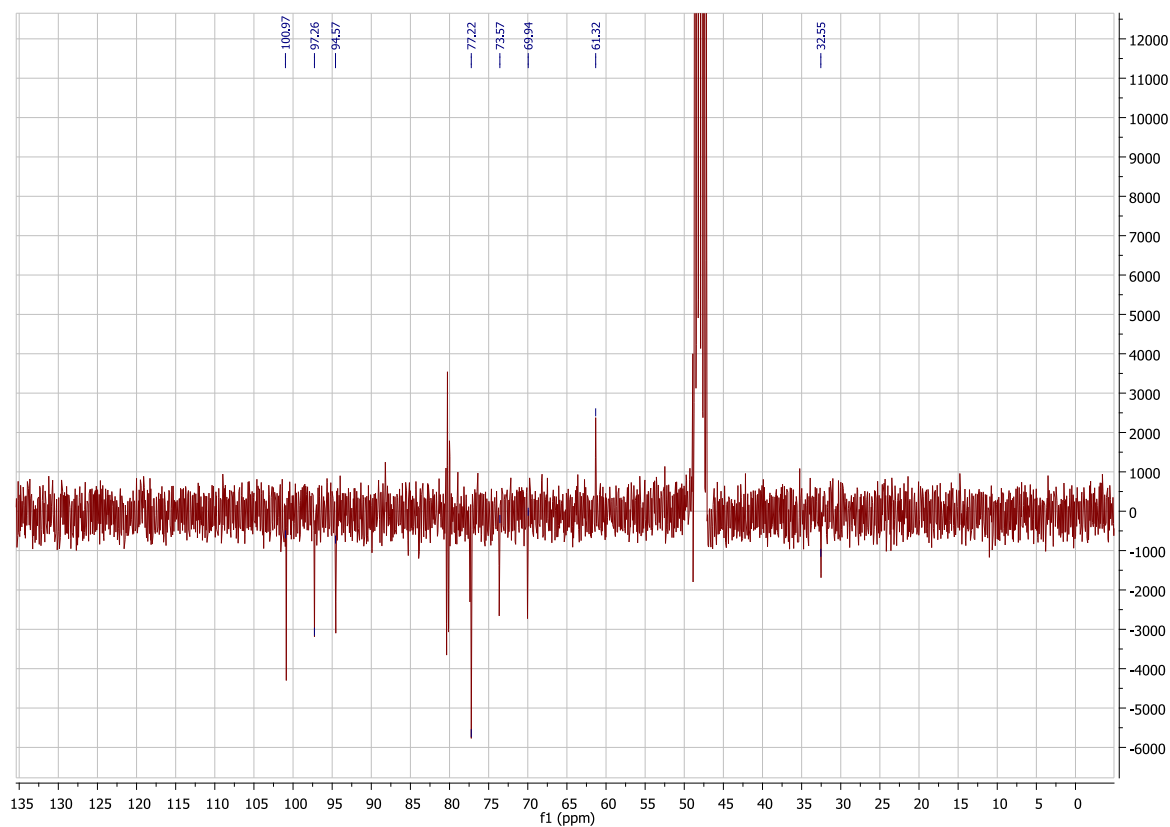
NMR-spektrum 9: ¹³C-spektrum av EtOAc, v1-2,s3NMR-spektrum 10: ¹H-spektrum av EtOAc, v1-2,s3

NMR-spektrum 11: ^{13}C -spektrum av EtOAc, v1-2,s4NMR-spektrum 12: ^1H -spektrum av EtOAc, v1-2,s4

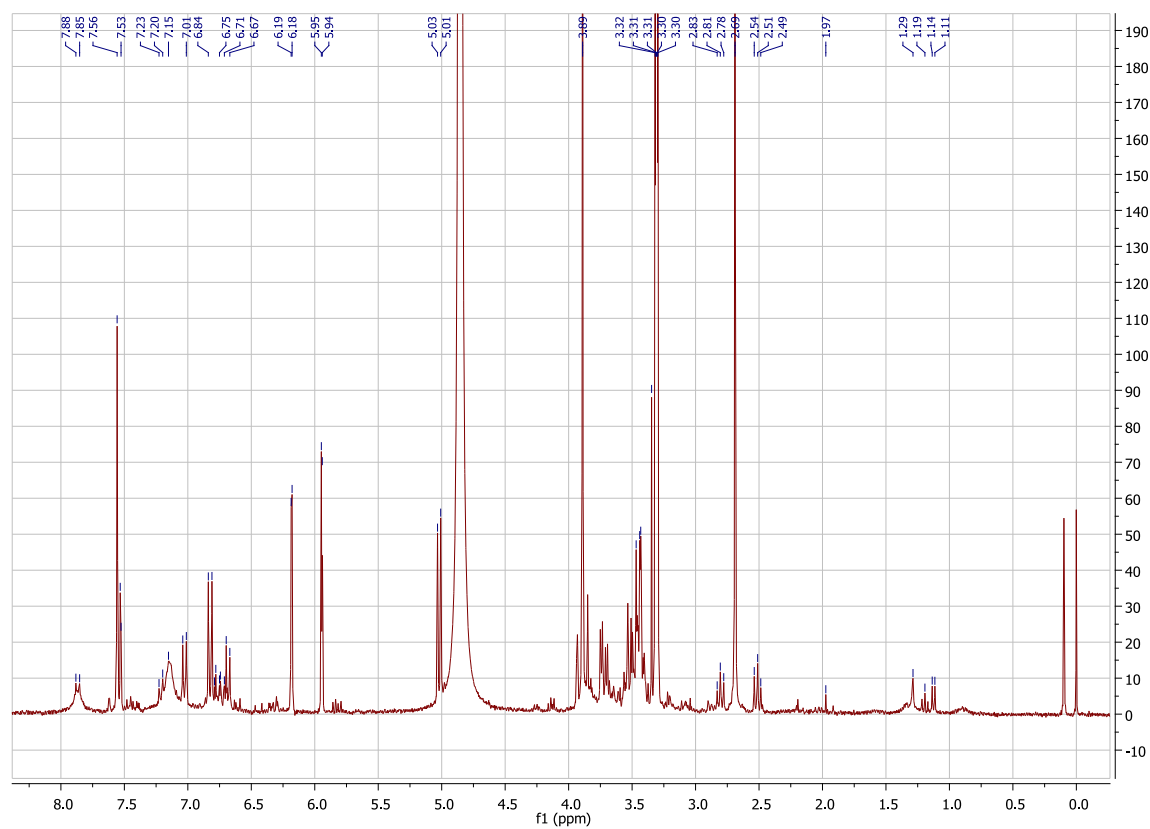


NMR-spektrum 15: ^1H -spektrum av BuOH, v2-3,s4,s2,v1NMR-spektrum 16: ^{13}C -spektrum av BuOH, v2-3,s4,s2,v1

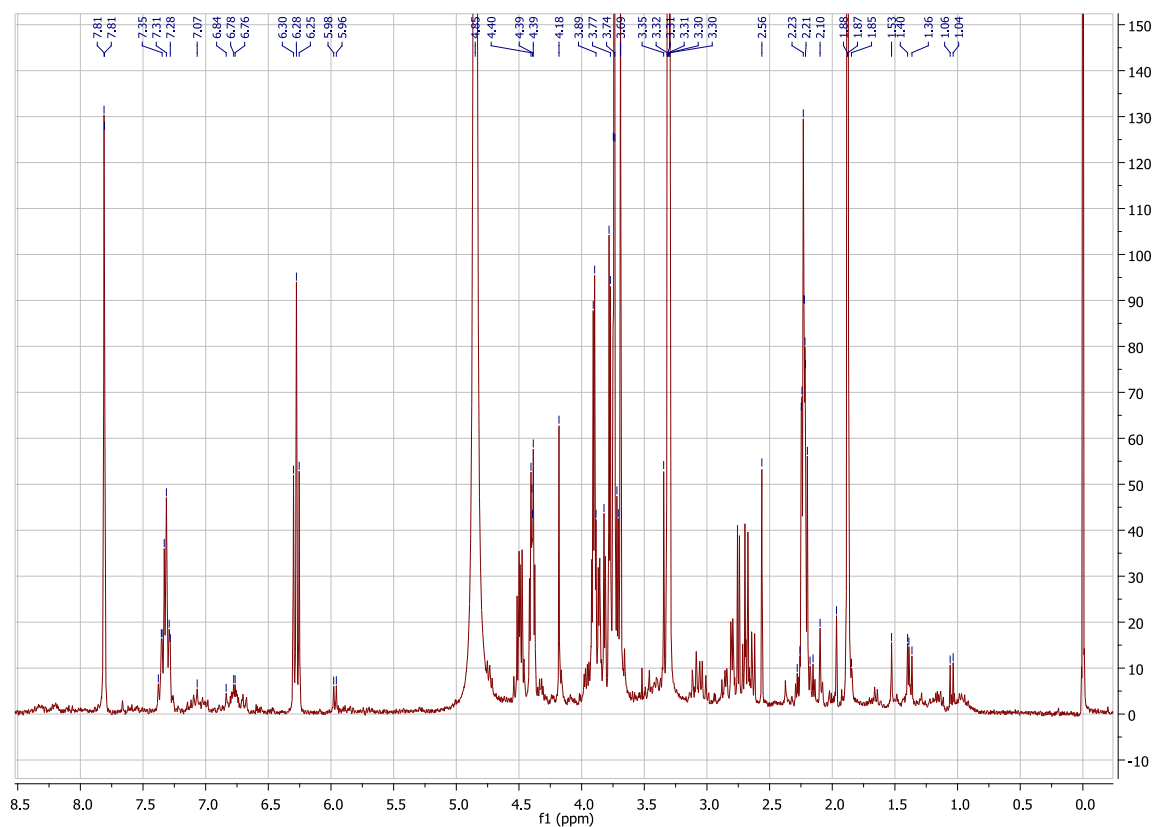
NMR-spektrum 17: ^1H -spektrum av EtOAc, v1-2,s4,m5NMR-spektrum 18: ^1H -spektrum av EtOAc, v1-2,s4,m3,prep8-9



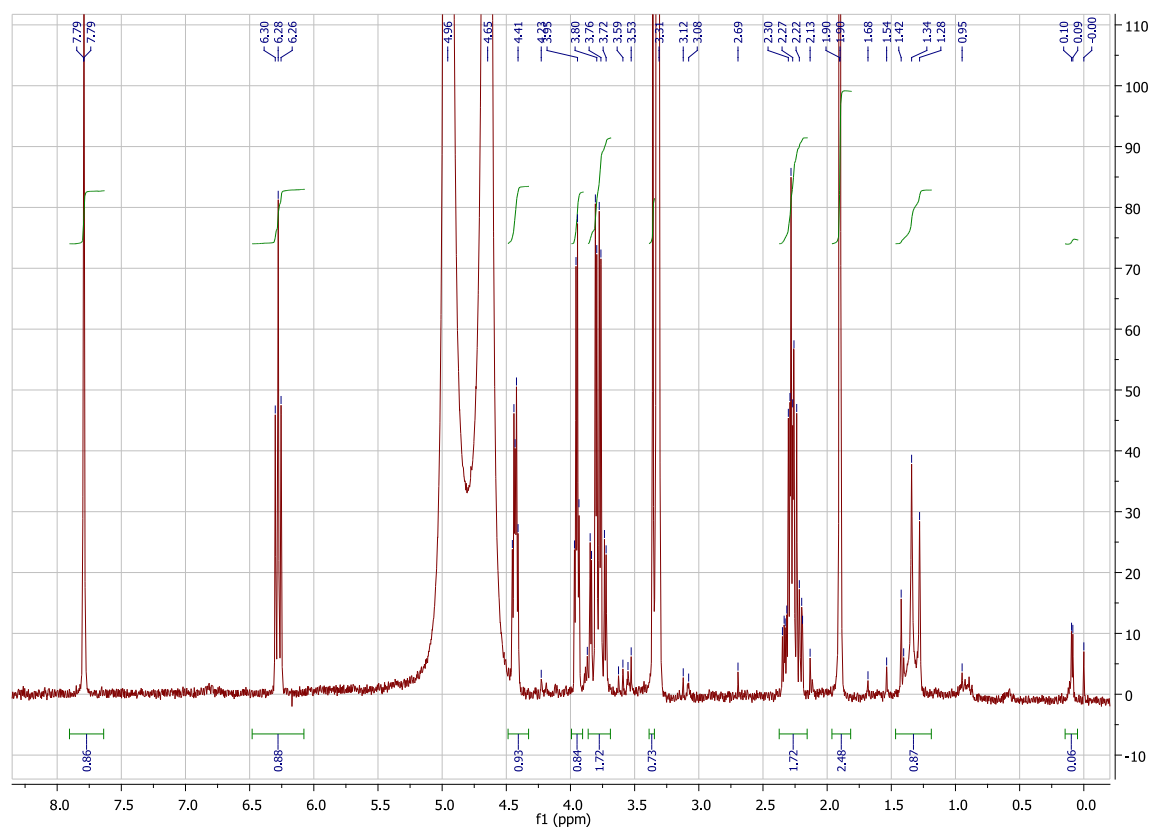
NMR-spektrum 19: APT-spektrum av EtOAc, v1-2,s4,m3,prep8-9



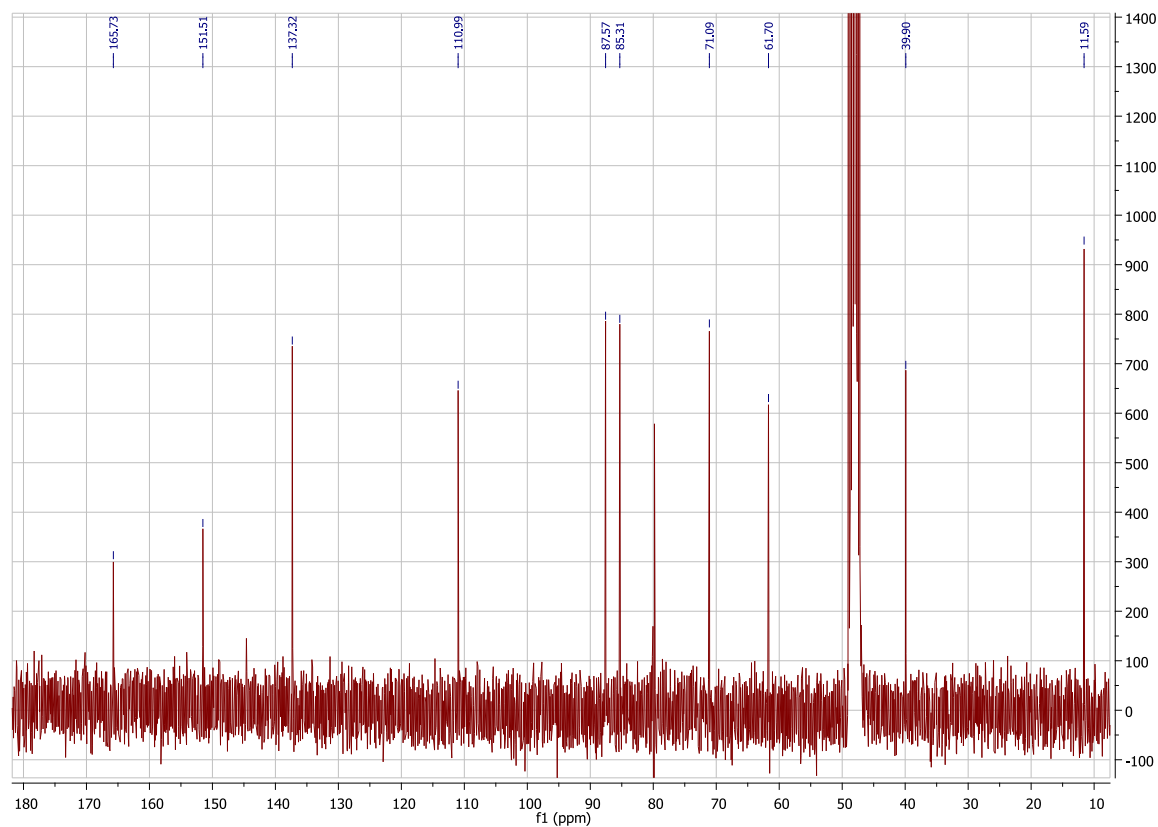
NMR-spektrum 20: ^1H -spektrum av EtOAc, v1-2,s4,m3



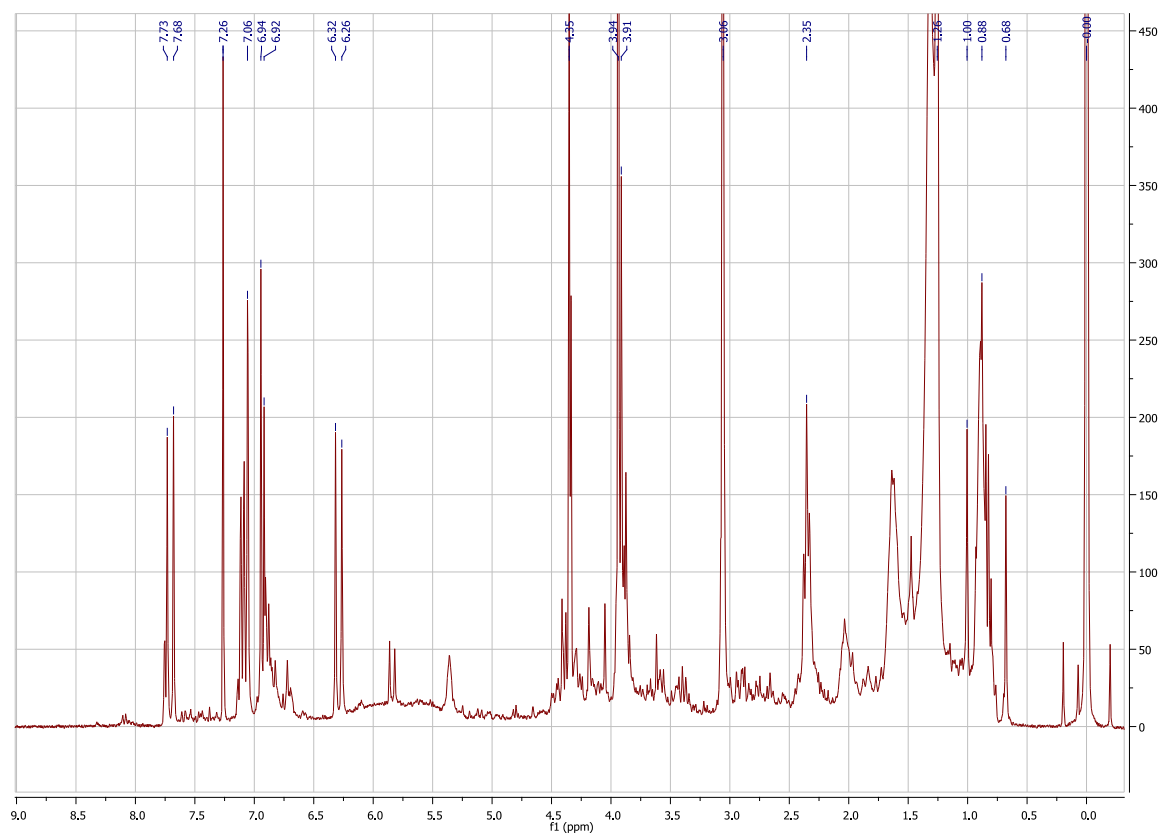
NMR-spektrum 21: ^1H -spektrum av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2)



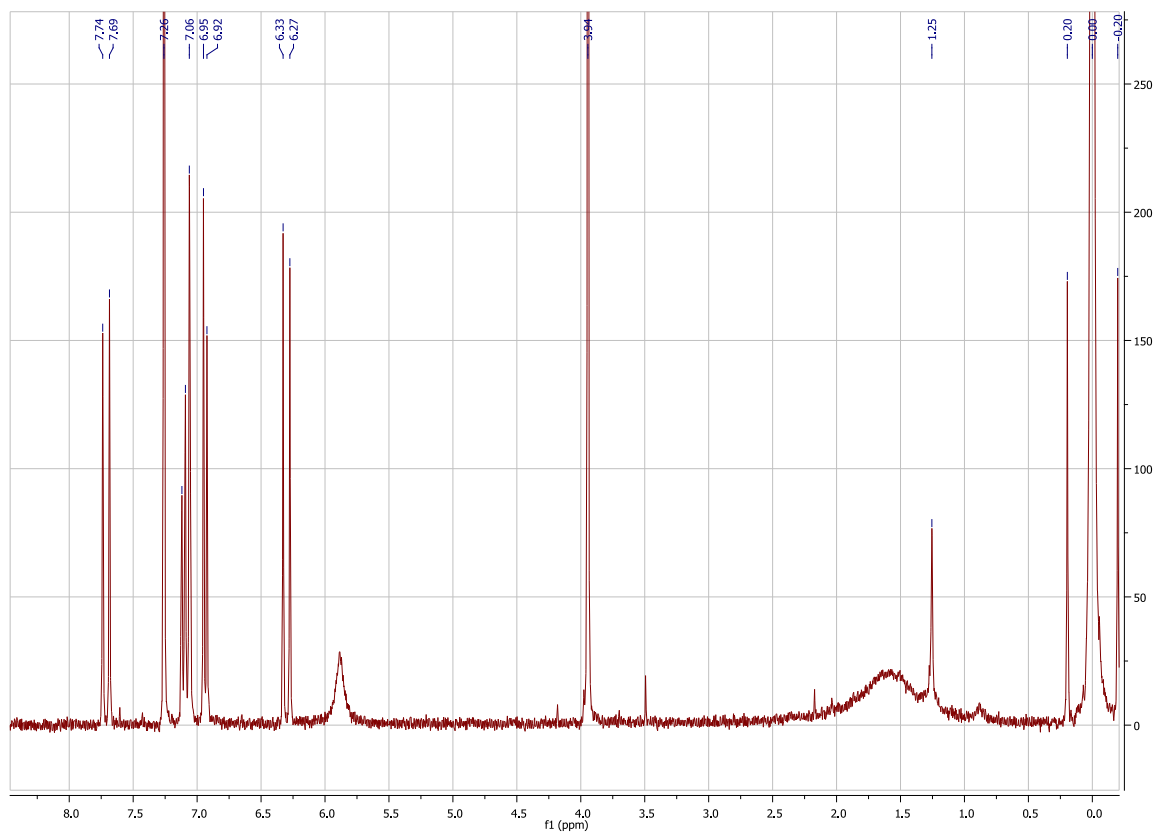
NMR-spektrum 22: ^1H -spektrum av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3



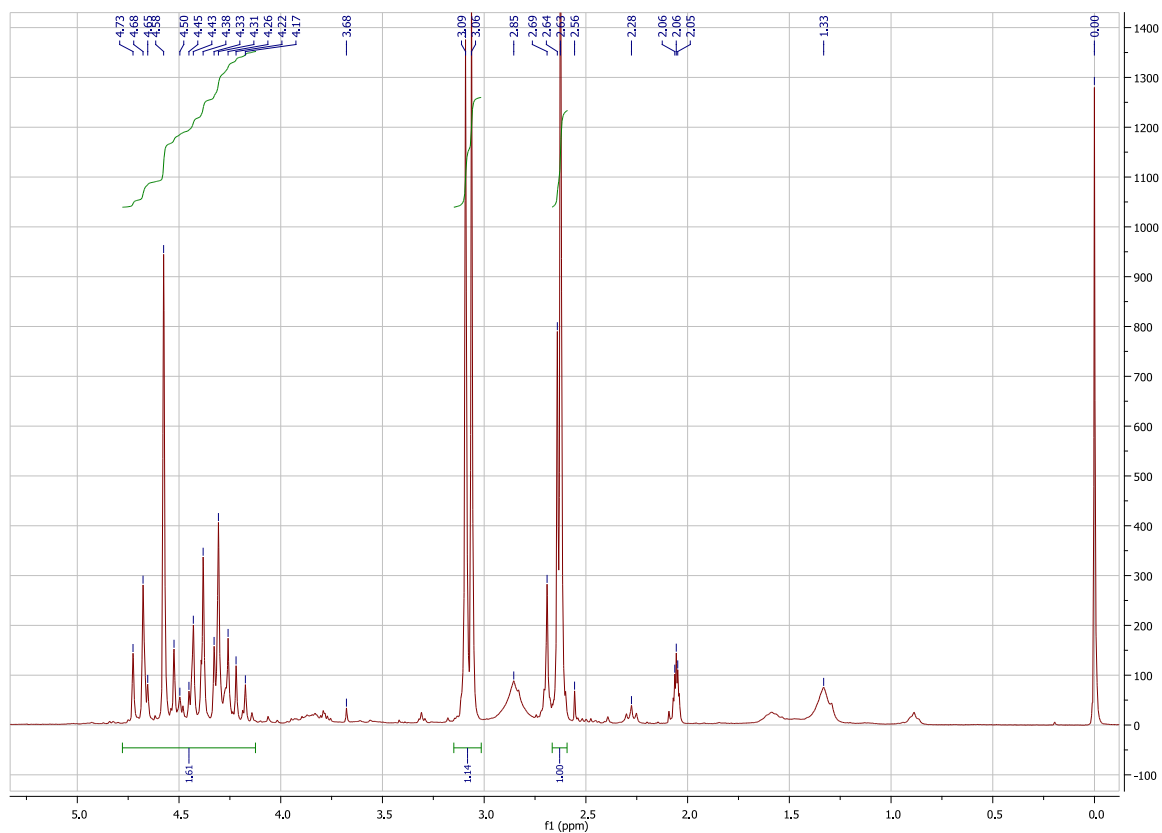
NMR-spektrum 23: ¹³C-spektrum av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3



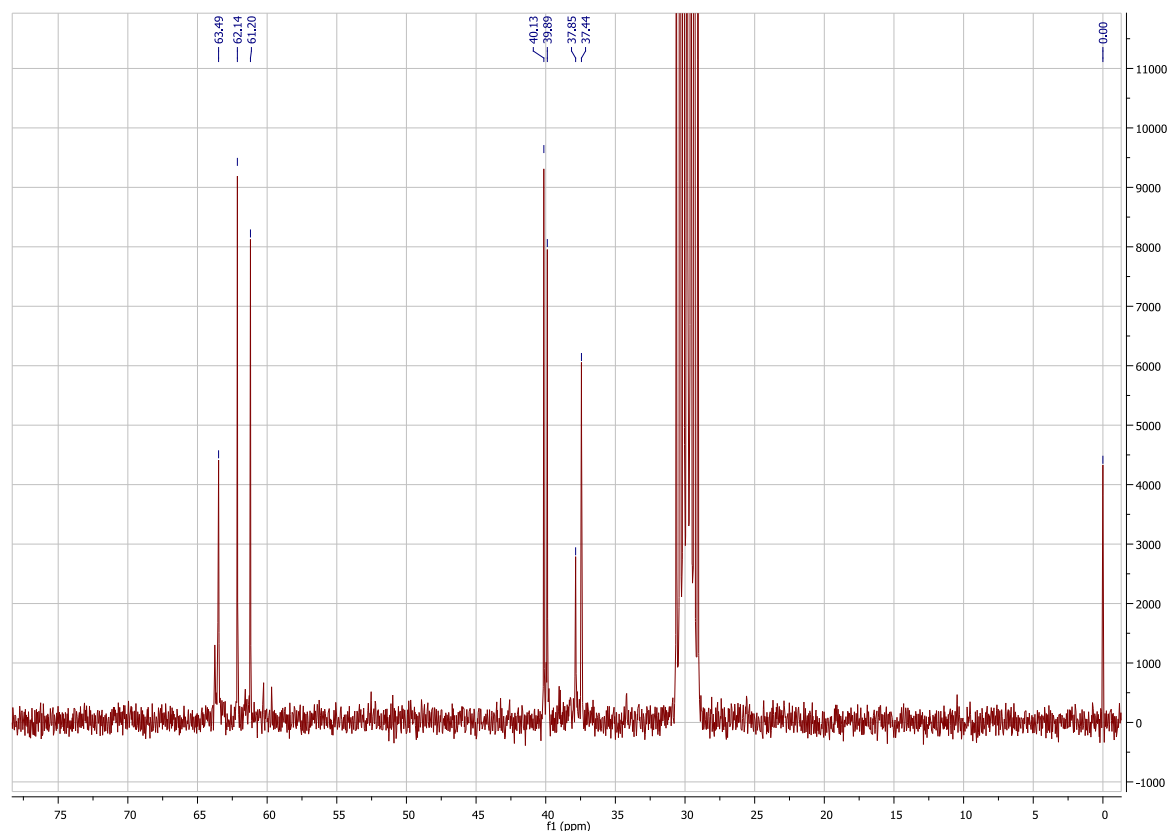
NMR-spektrum 24: ¹H-spektrum av DCM, v4,v3



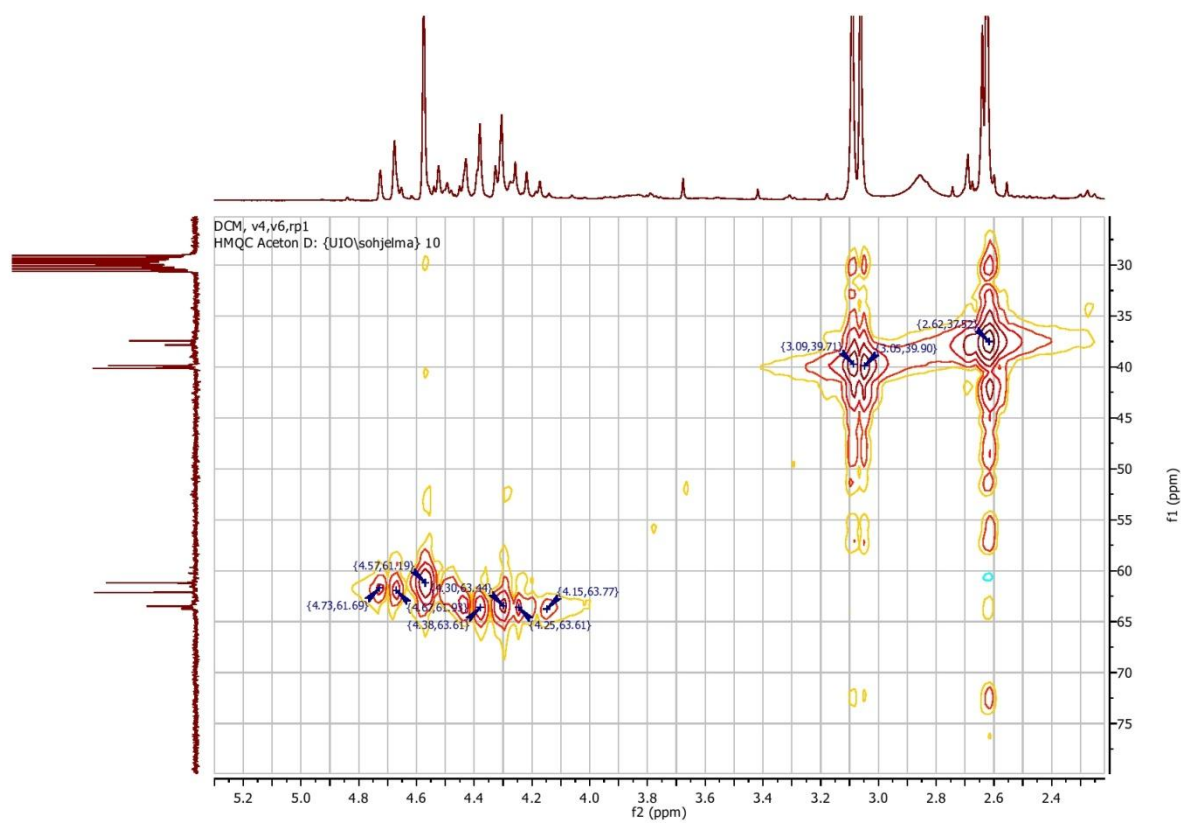
NMR-spektrum 25: ¹H-spektrum av ferulasyre



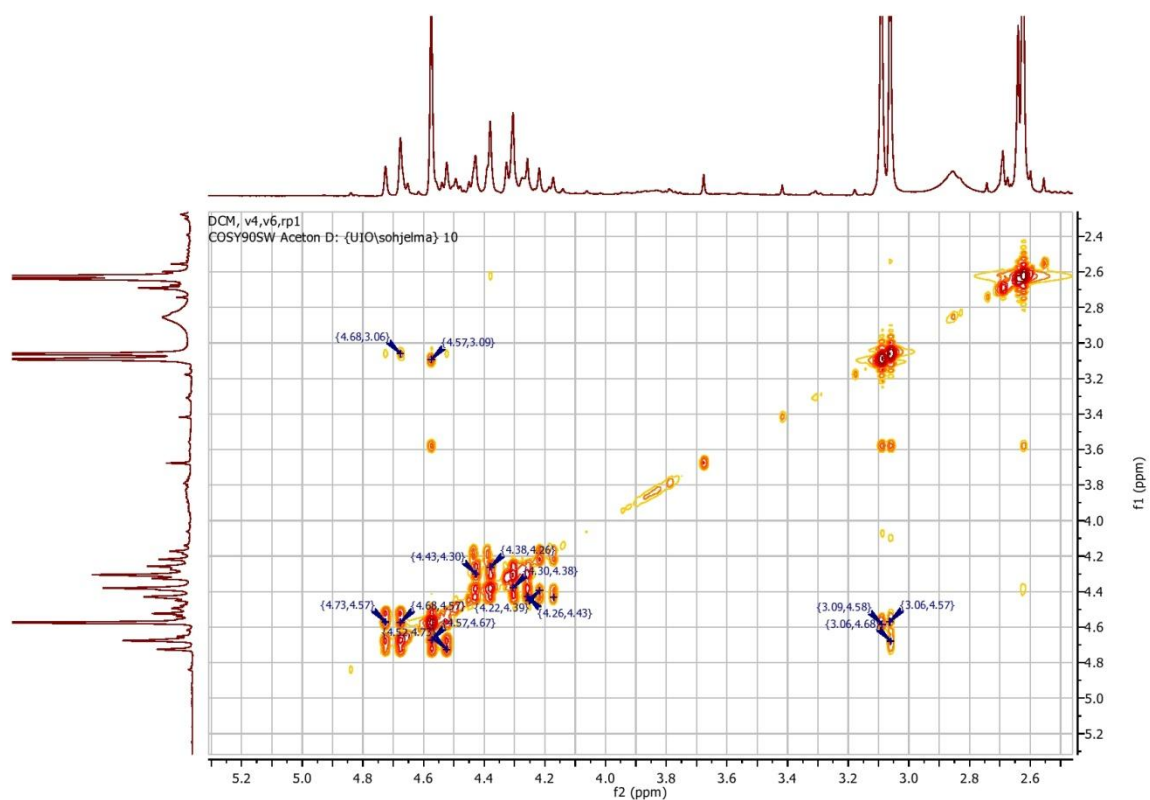
NMR-spektrum 26: ¹H-spektrum av DCM, v4,v6,rp1



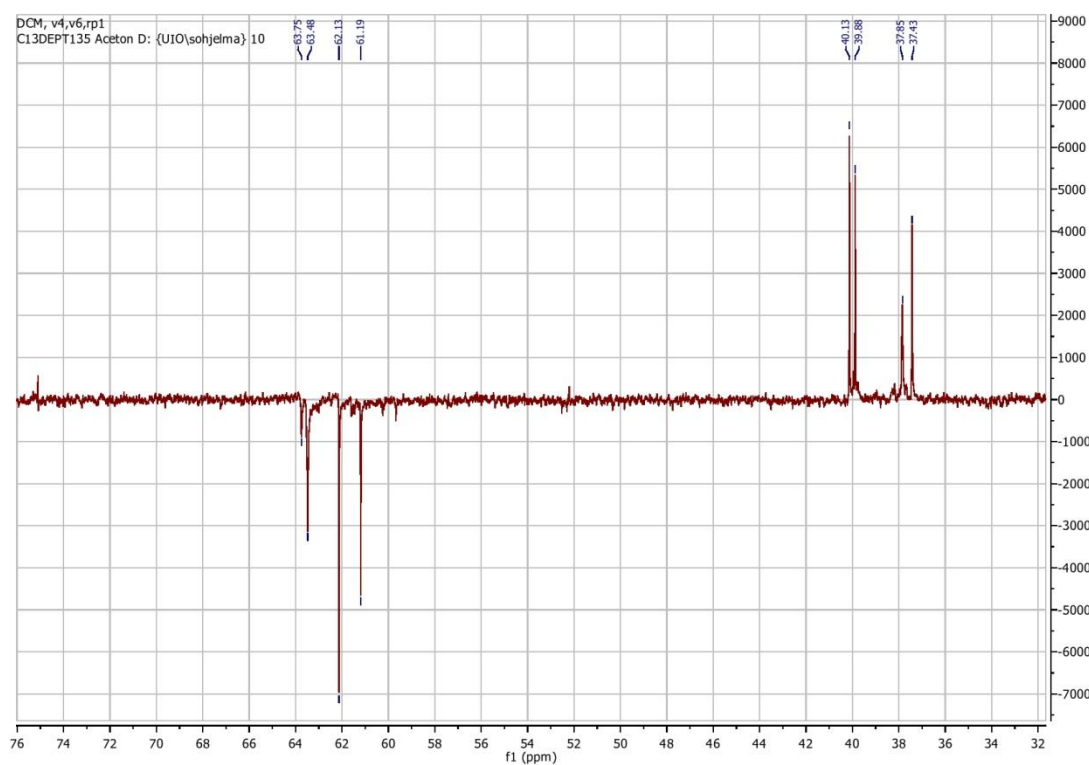
NMR-spektrum 27: ^{13}C -spektrum av DCM, v4,v6,rp1



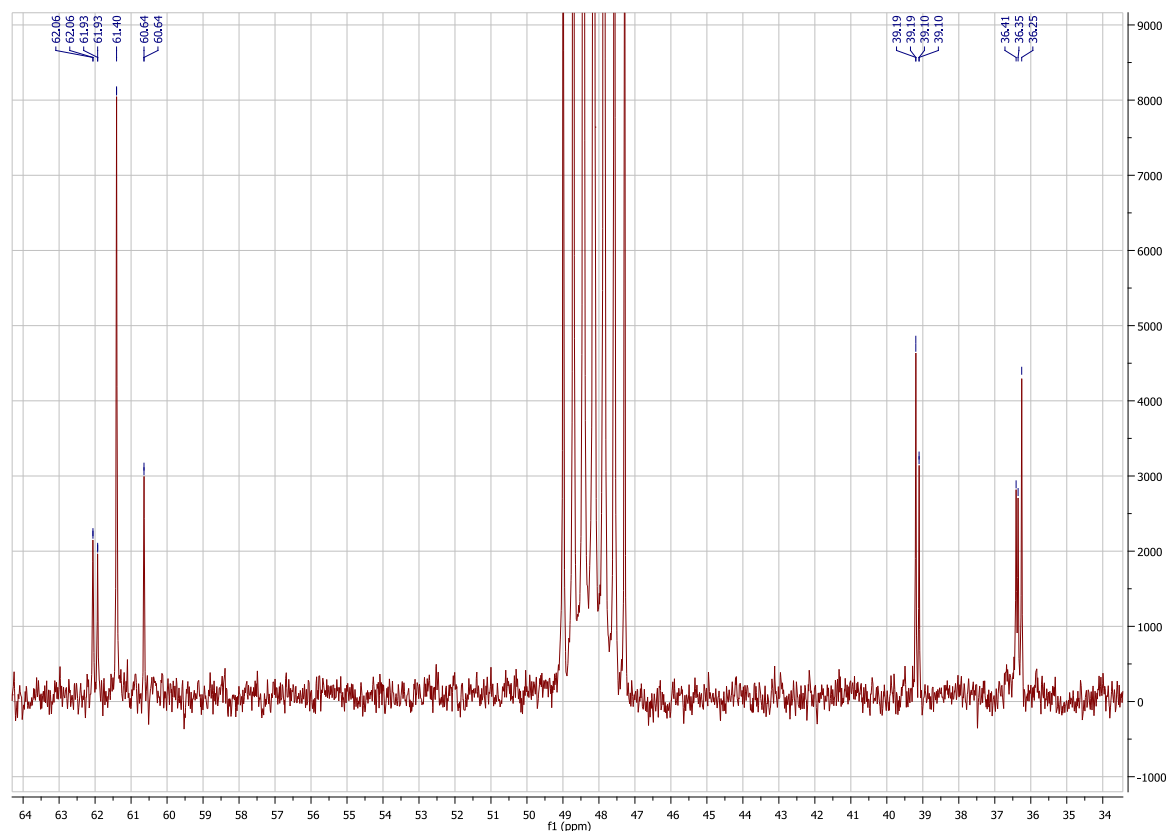
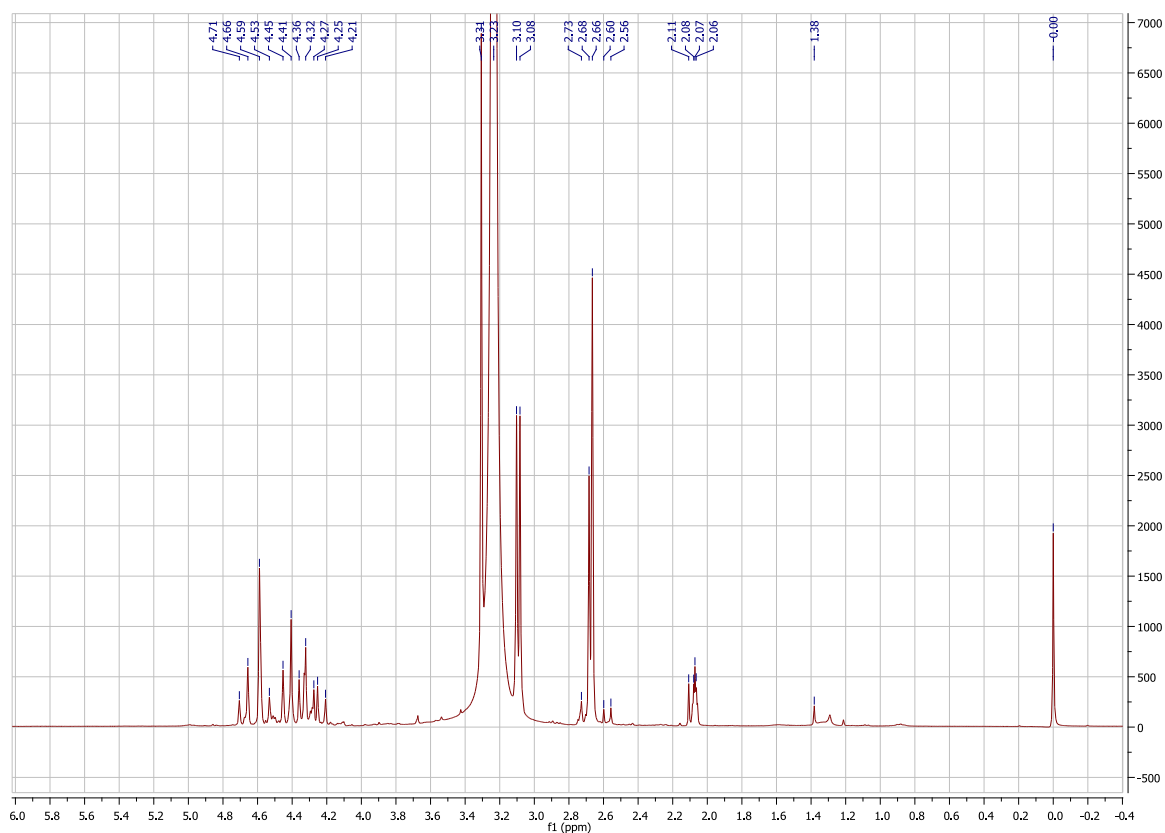
NMR-spektrum 28: HMQC-spektrum av DCM, v4,v6,rp1

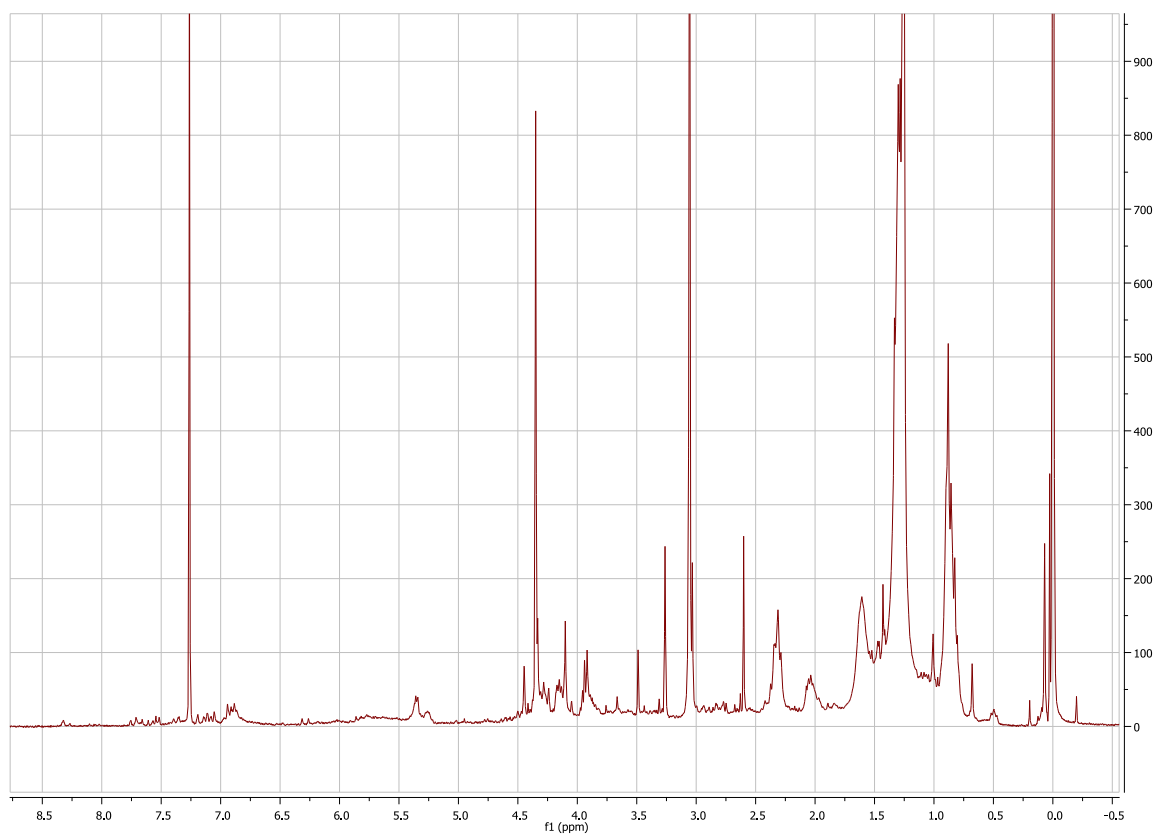


NMR-spektrum 29: COSY-spektrum av DCM, v4,v6,rp1

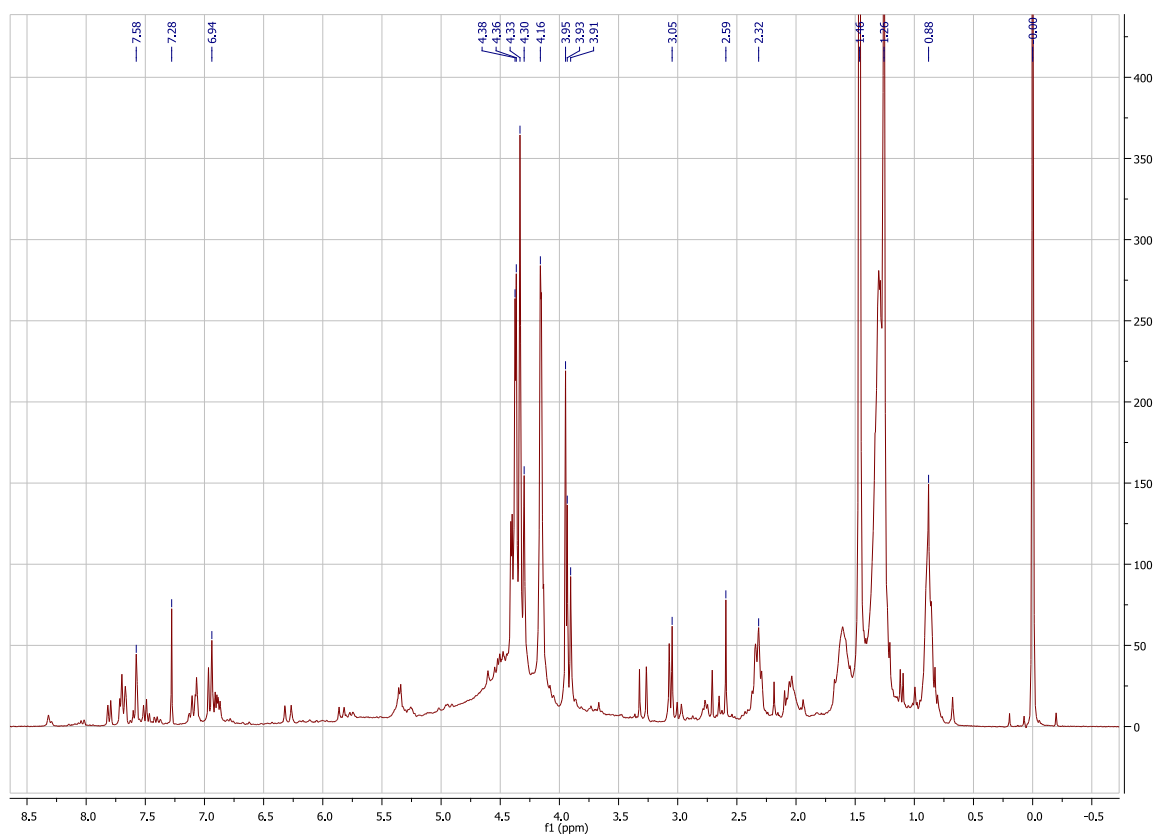


NMR-spektrum 30: DEPT135-spektrum av DCM, v4,v6,rp1

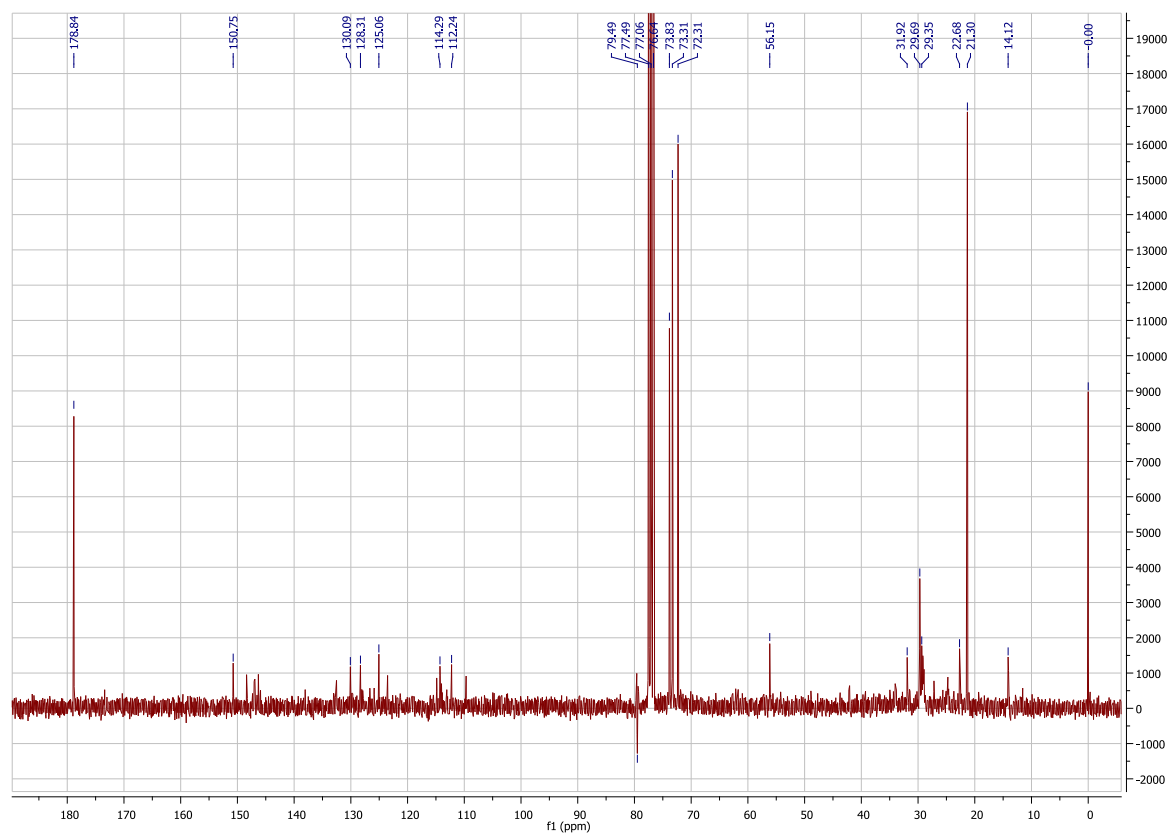
NMR-spektrum 31: ¹³C-spektrum av DCM, v4,v6,rp1,rp1NMR-spektrum 32: ¹H-spektrum av DCM, v4,v6,rp1,rp1



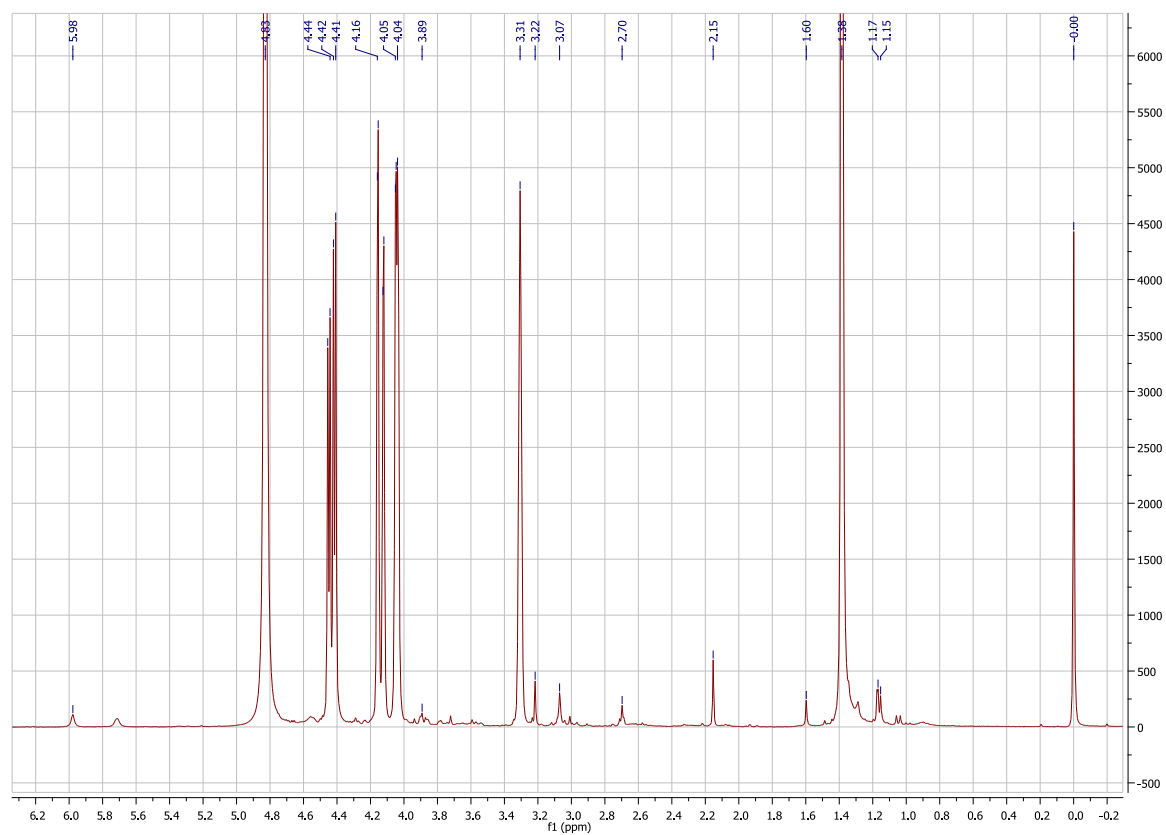
NMR-spektrum 33: ^1H -spektrum av DCM, v5,v1



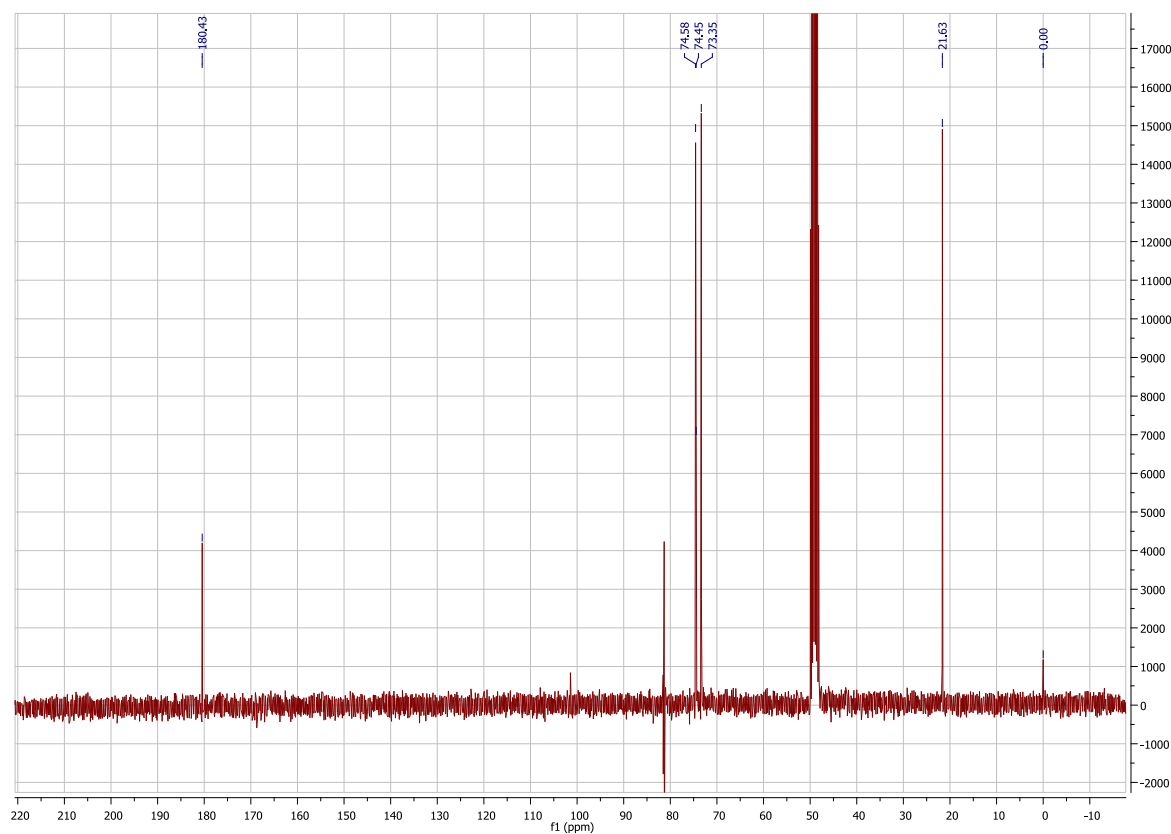
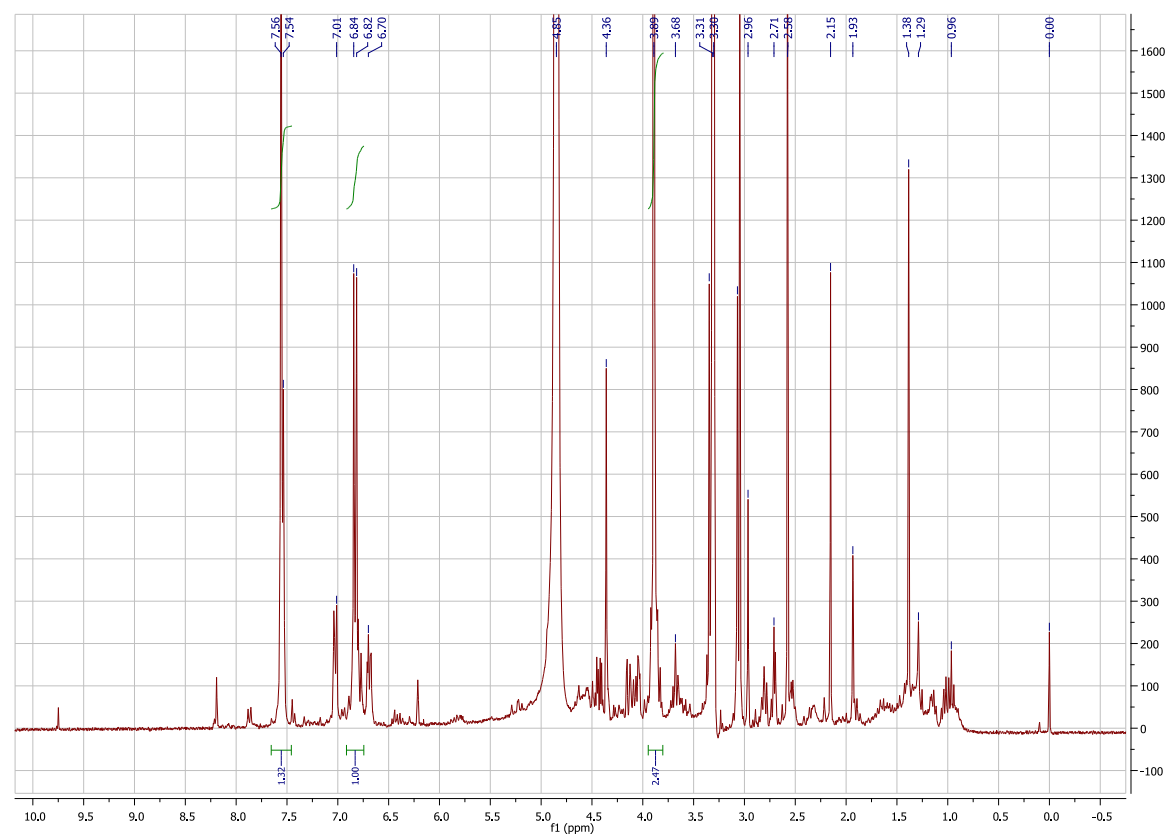
NMR-spektrum 34: ^1H -spektrum av DCM, v6,v1

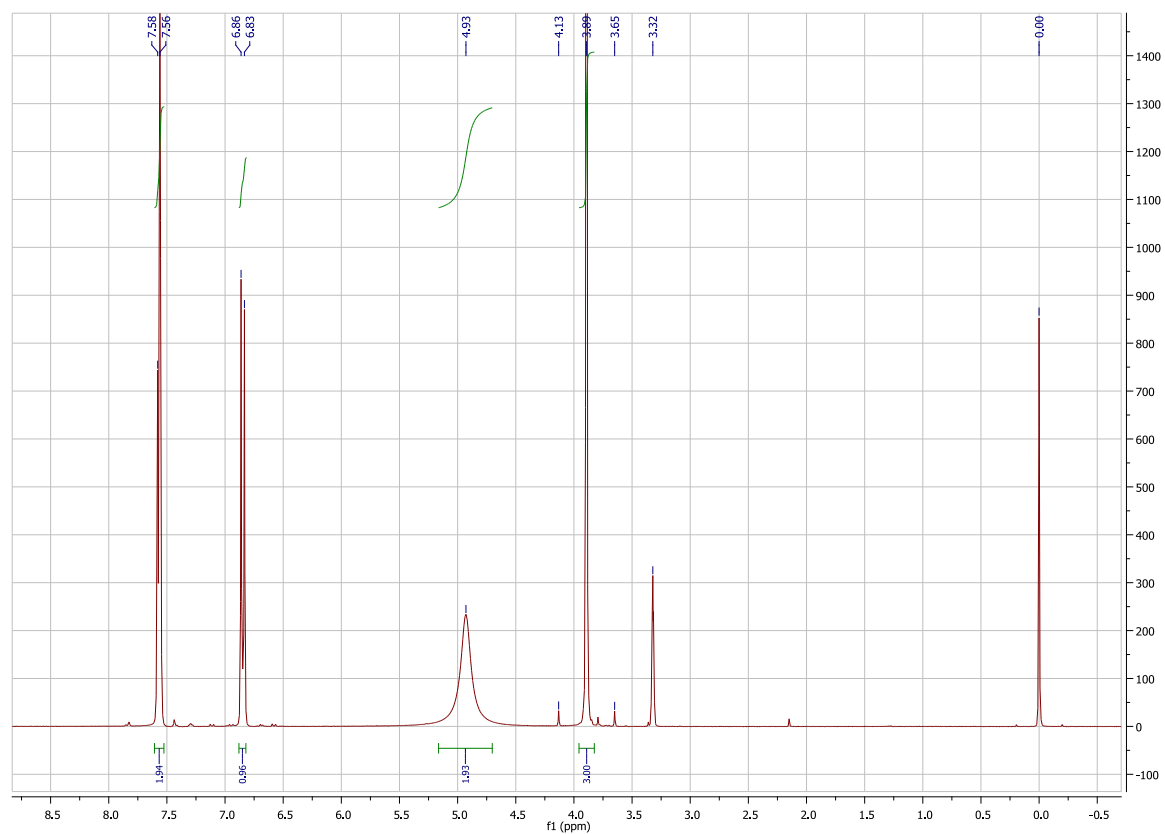


NMR-spektrum 35: ¹³C-spektrum av DCM, v6,v1

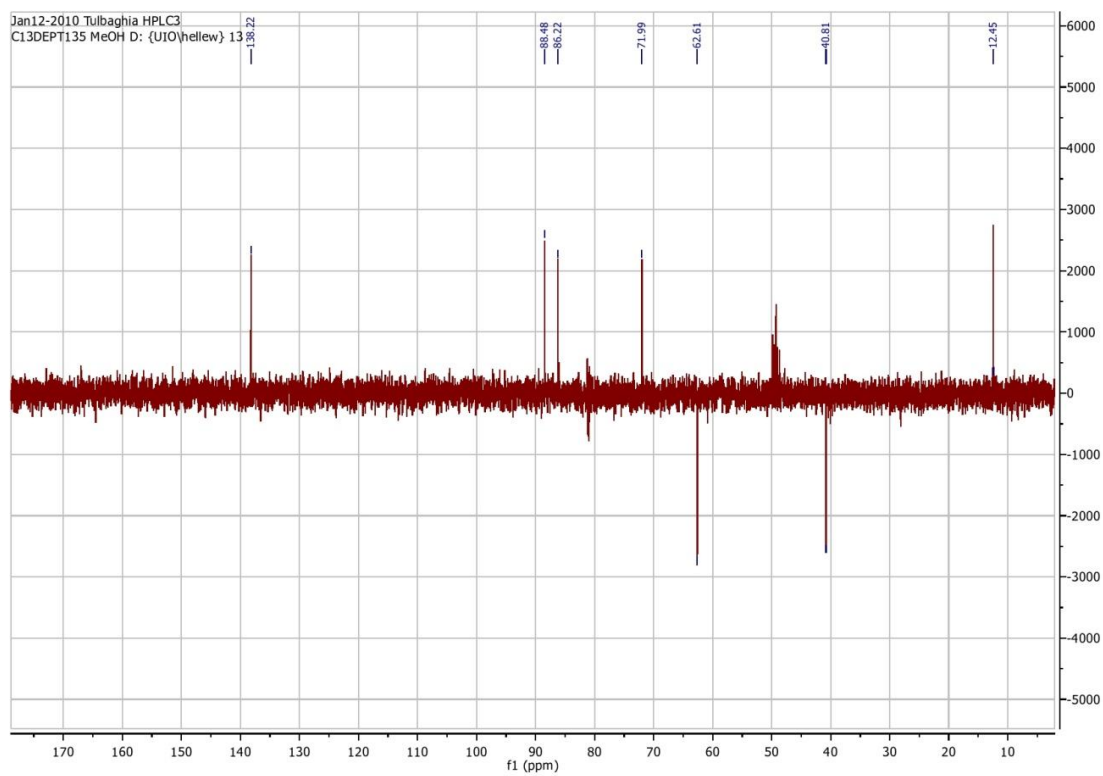


NMR-spektrum 36: ¹H-spektrum av DCM, v6,v1,rp1

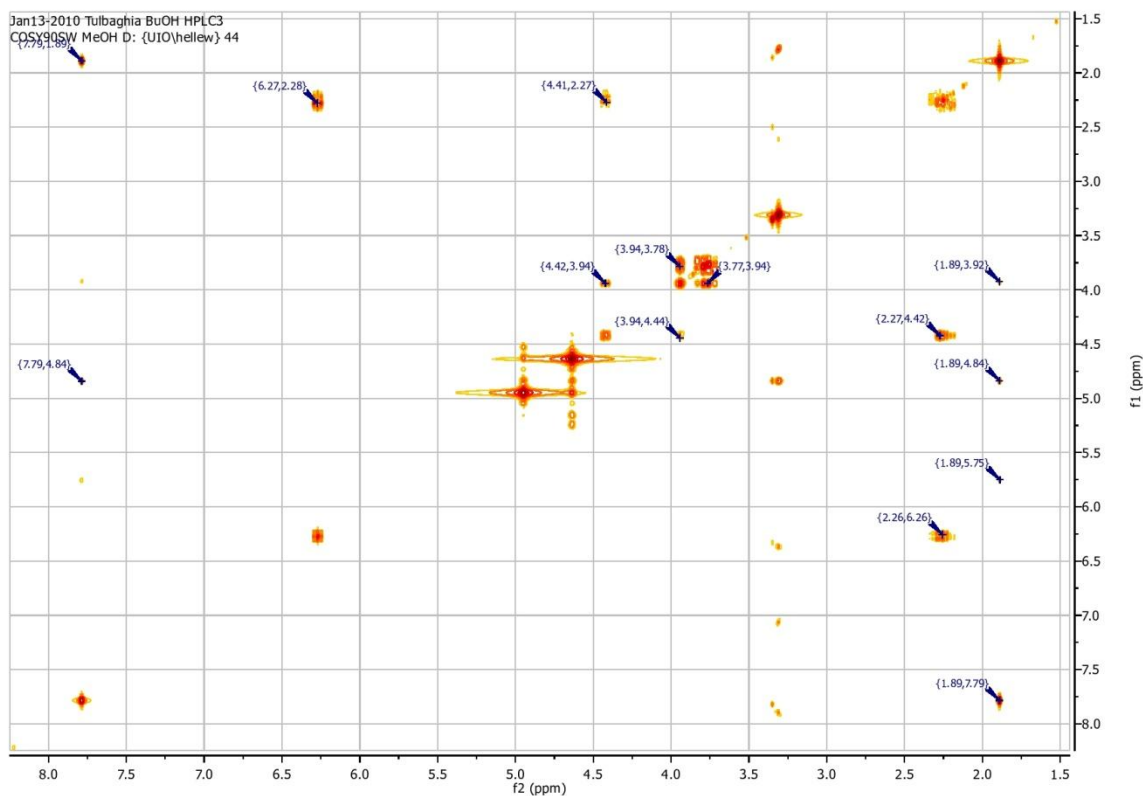
NMR-spektrum 37: ¹³C-spektrum av DCM, v6,v1,rp1NMR-spektrum 38: ¹H-spektrum av DCM, v6,v1,rp3



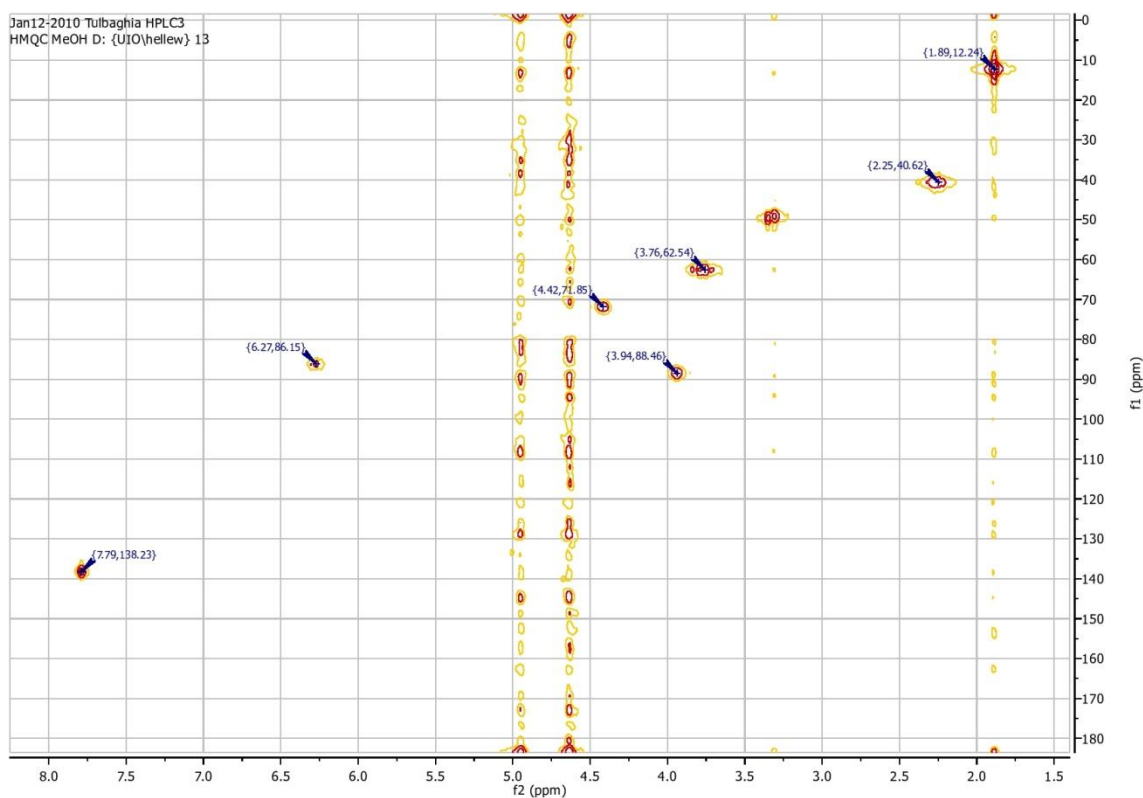
NMR-spektrum 39: ¹H-spektrum av vaniljesyre



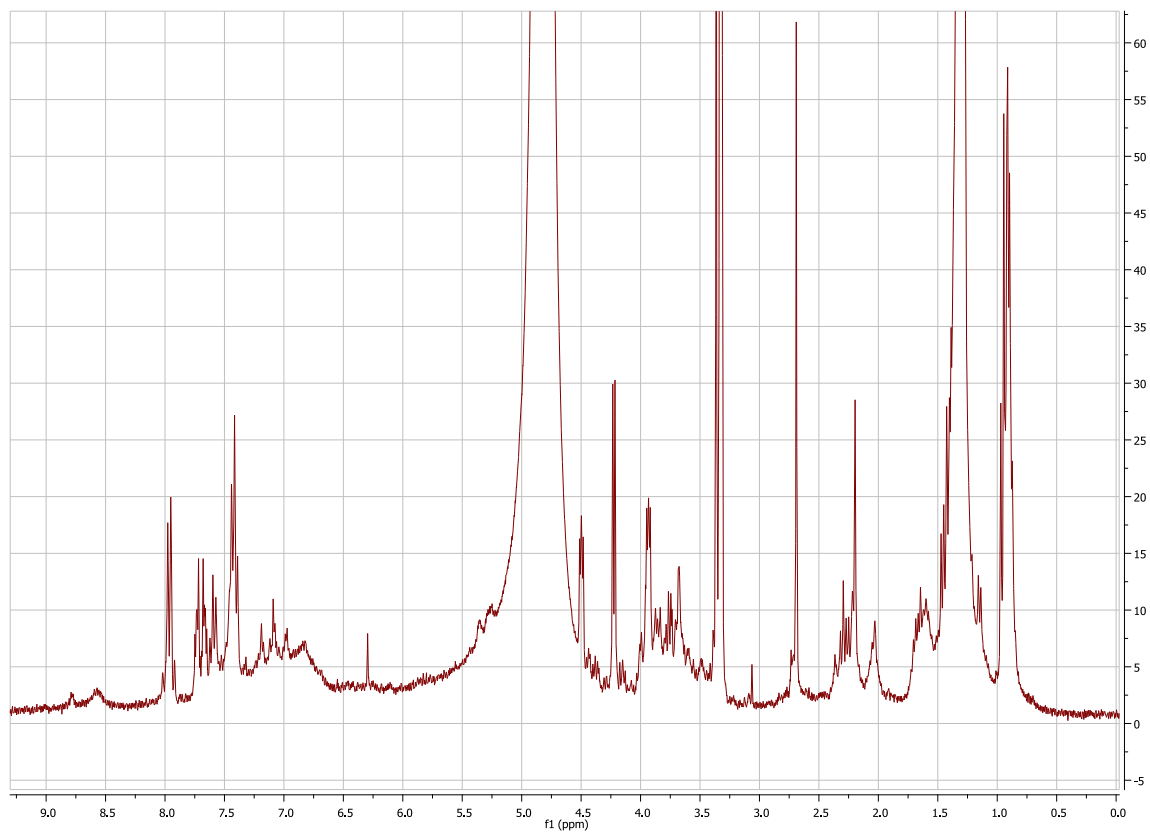
NMR-spektrum 40: ¹³C-DEPT135-spektrum av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3



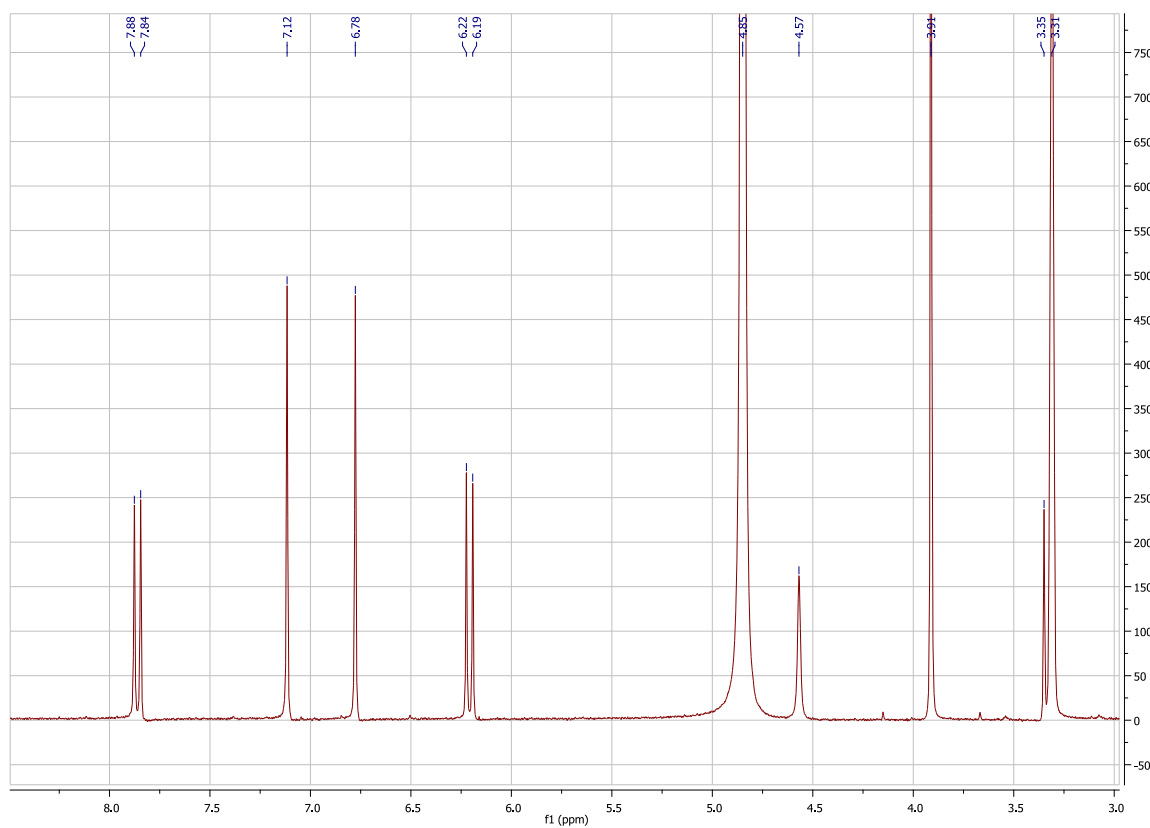
NMR-spektrum 41: COSY-spektrum av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3



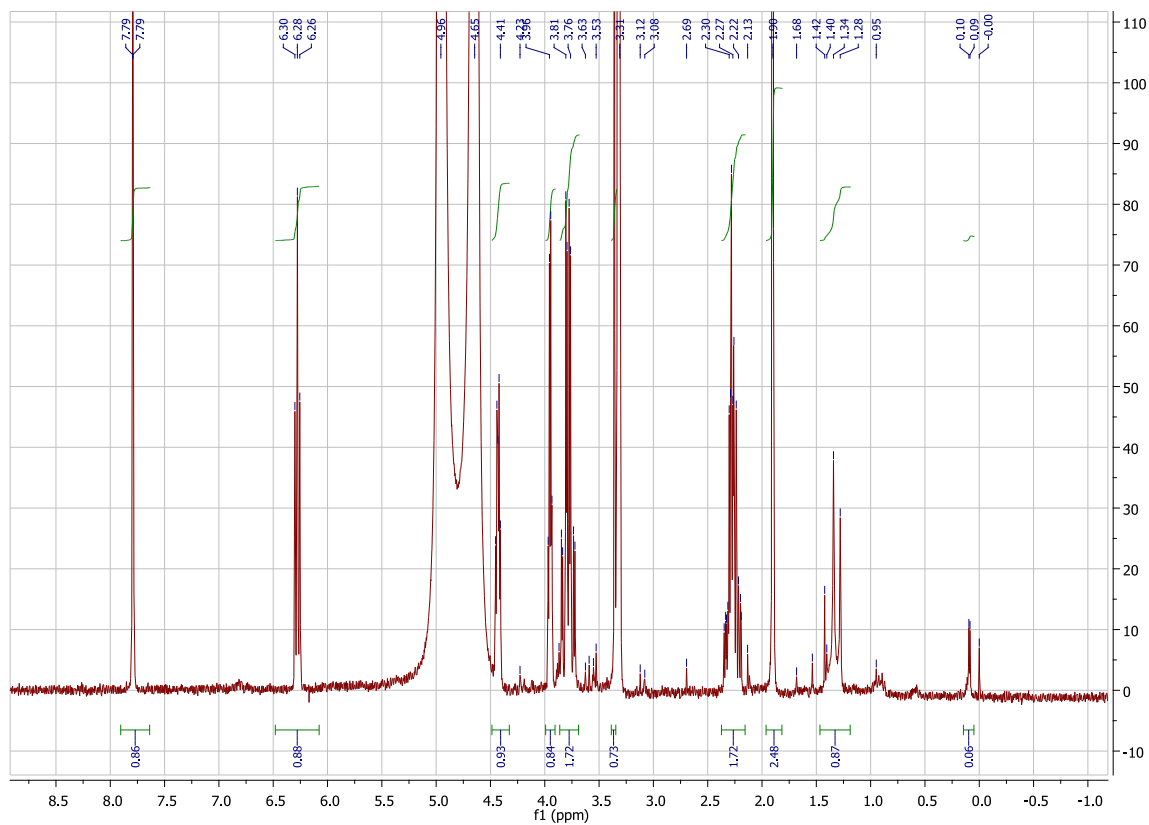
NMR-spektrum 42: HMQC-spektrum av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3



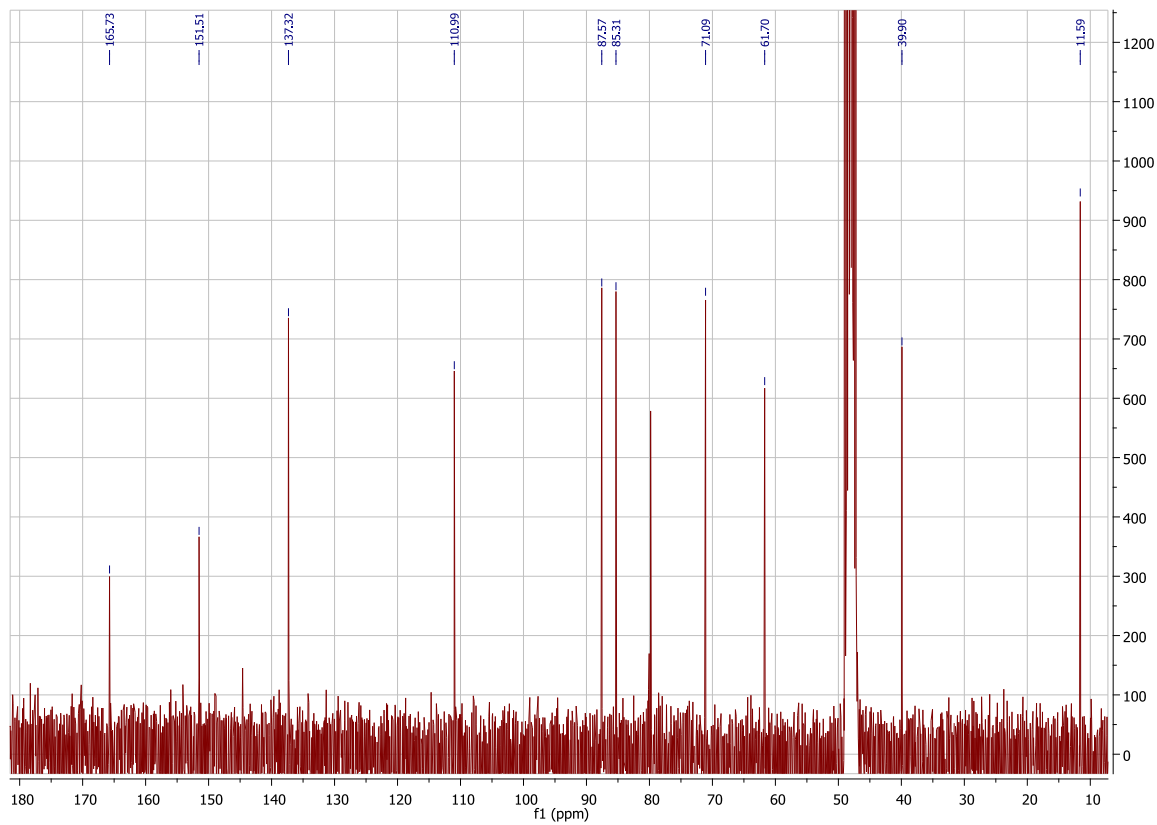
NMR-spektrum 43: ^1H -spektrum av EtOAc, v1-2,s6



NMR-spektrum 44: ^1H -spektrum av scopoletin



NMR-spektrum 45: ¹H-spektrum av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3



NMR-spektrum 46: ¹³C-spektrum av BuOH, v2-3,s4,s2,v3-4,m3(2),prep3



Kildeliste

Akowuah, G. A., Zhari, I., Sadikun, A. og Norhayati, I. (2006). "HPTLC densitometric analysis of *orthosiphon stamineus* leaf extracts and inhibitory effect on xanthine oxidase activity." *Pharmaceutical Biology* **44**: 65-70.

Avalos, M., Babiano, R., Carretero, M. J., Cintas, P., Higes, F. J., Jiménez, J. L. og Palacios, J. C. (1998). "The structure of glycosyl amides: a combined study by NMR spectroscopy, X-ray crystallography, and computational chemistry." *Tetrahedron* **54**: 615-628.

Blois, M. S. (1958). "Antioxidant determinations by the use of a stable free radical." *Nature* **181**: 1199-1200.

Burton, S. G. og Kaye, P. T. (1991). "Isolation and characterisation of sulphur compounds from *Tulbaghia violacea*." *Planta Medica* **58**: 295-296.

Chang, Y. C., Lee, F. W., Chen, C.S., Huang, S. T., Tsai, S. H., Huang, S. H. og Lin, C. M. (2007). "Structure-activity relationship of C6-C3 phenylpropanoids on xanthine oxidase-inhibiting and free radical-scavenging activities." *Free Radical Biology & Medicine* **43**: 1541-1551.

De Pascual Teresa, J., Aubanell Hernandez, J. C., San Feliciano, A. og Miguel del Corral, J. M. (1980). "Saccharinic acid lactone from *Astragalus lusitanicus* lam., (-)-2-C-methyl-D-erythrono-1,4-lactone." *Tetrahedron Letters* **21**: 1359-1360.

Duncan, A. C., Jäger, A. K. og Staden, J. (1999). "Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors." *Journal of Ethnopharmacology*, **68**: 63-70.

Ellestad M. H. (2007). "Xantine oxidase inhibitors the unappreciated treatment for heart failure." *Cardiovascular & hematological disorders drug targets* **7**: 291-294.

Felleskatalogen. "Allopur." www.felleskatalogen.no Aksessert 24.04.10.

Halliwell, B. (2005). "Free radicals and other reactive species in disease." Encyclopedia of Life Science. Akssert 19.04.2010 fra www.els.net

Halliwell, B. og Gutteridge, J. M. C. (1999). "Free radicals in biology and medicine." 3. utgave, Oxford University Press, New York s 936.

Ishihara, K. og Hirano, T. (2002). "IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease." Cytokine & Growth Factor Reviews **13**: 357-368.

Itagaki, S., Kurokawa, T., Nakata, C., Saito, Y., Oikawa, S., Kobayashi, M., Hirano, T. og Iseki, K. (2008). "In vitro and in vivo antioxidant properties of ferulic acid: A comparative study with other natural oxidation inhibitors." Food Chemistry **114**: 466-471.

Kallen, K. J., Büschenfelde, K. H. M. og Rose-John, S. (1997). "The therapeutic potential of interleukin-6 hyperagonists and antagonists." Expert Opinion on Investigational Drugs **6**: 237-266.

Kanji Foundry Press, An Illustrated Companion to Pharmacology.
www.thekanjifoundrypress.com Akssert 05.05.10.

Kubec, R., Velisek, J. and Musah, R. A. (2002). "The amino acid precursors and odor formation in society garlic (*Tulbaghia violacea*)." Phytochemistry **60**: 21-25.

Malterud K. E. (2010). Muntlig meddelelse. Farmasøytisk institutt, Universitetet i Oslo.

Malterud, K. E., Farbrot, T. L., Huse, A. E. og Sund, R. B. (1993). "Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones". Pharmacology **47**: 77-85.

Malterud, K. E. og Rydland, K. (2000). "Inhibitors of 15-lipoxygenase from orange peel." Journal of Agricultural and Food Chemistry **48**: 5576-5580.

Nakayama, T., Honda, K., Omura, H. og Hayashi, N. (2003). "Oviposition stimulants for the tropical swallowtail butterfly, *Papilio polytes*, feeding on a rutaceous plant, *Toddalia asiatica*." Journal of Chemical Ecology **29**: 1621-1634.

Ono, H., Nishida, R. og Kuwahara, Y. (2000). "A dihydroxy- γ -lactone as an oviposition stimulant for the swallowtail butterfly, *Papilio bianor*, from the rutaceous plant, *Orixa japonica*." Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry **64**: 1970-1973.

Özyürek, M., Bektasoglu, B., Güclü, K. og Apak, R. (2009). "Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolic and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method." Analytica Chimica Acta **636**: 42-50.

Pham, A. T. (2009). "Del I. Kjemiske og biokjemiske studier av den maliske medisiplanten *Terminalia macroptera*. Del II. Etnofarmakologiske studier i Mali." Avdeling for farmasøytisk kjemi, Farmasøytisk institutt.

Pino, J. A., Quijano-Celis, C. E. og Fuentes, V. (2008). "Volatile Compounds of *Tulbaghia violacea* Harv." Journal of Essential Oil-Bearing Plants **11**: 203-207.

Ramesar, S., Baijnath, H., Govender, T. og Mackraj, I. (2008). "Angiotensin I-converting enzyme inhibitor activity of nutritive plants in KwaZulu-Natal." Journal of Medicinal Food **11**: 331-336.

Reddy, G. B. S. og Dhananjaya, N. (2000). "Chemical investigation of *Mycale mytilorum* and a study on toxicity and antidiabetic activity of 5-octadecylpyrrole-2-carboxylaldehyde." Bioorganic & Medicinal Chemistry **8**: 27-36.

Scott, G. og Springfield, E.P. (2004). "*Tulbaghia rhizoma*." www.plantzafrica.com/medmonographs Aksessert 12.04.10.

Smolen, J. S. og Maini, R. N. (2006). "Interleukin-6: a new therapeutic target." Arthritis Research & Therapy **8**: 2-5.

Tamburan, S., Klaasen, J., Mabusela, W. T., Cannon, J. F., Folk, W., og Johnson, Q. (2006). "*Tulbaghia alliacea* phytotherapy: A potential anti-infective remedy for candidiasis." Phytotherapy Research **20**: 844-850.

The International Plant Names Index. www.ipni.org Aksessert 29.04.10.

Wyk, B. E., Oudtshoorn. B. og Gericke, N. (2009). "Medicinal plants of South Africa."
2. utgave, Tien Wah Press Ltd, Singapore, s 298.